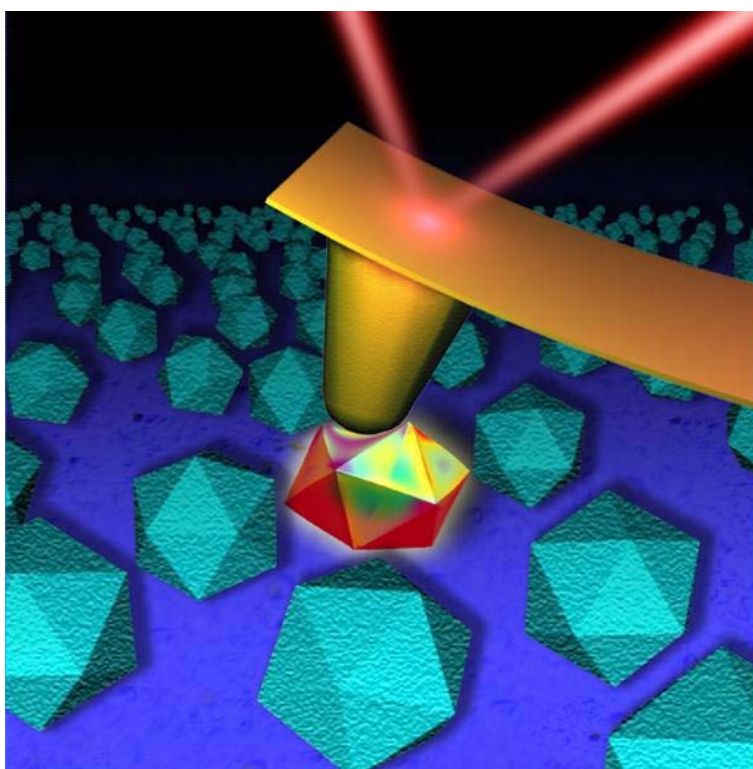


# **Caracterización estructural y mecánica de nanosistemas biológicos mediante microscopía de fuerzas atómicas**



Tesis Doctoral

**Carolina Carrasco Pulido**

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Física de la Materia Condensada





**Caracterización estructural y mecánica de nanosistemas  
biológicos mediante microscopía de fuerzas atómicas**

*Memoria presentada por Carolina Carrasco Pulido  
para optar al grado de Doctora en Ciencias Físicas  
dirigida por el Dr. Pedro José de Pablo Gómez  
en el Departamento de Física de la Materia Condensada de la  
Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid*

*Madrid, septiembre 2008*

*Imagen de la portada:* representación artística de partículas víricas individuales adsorbidas sobre una superficie de vidrio. Portada de la Revista Española de Física, 2007, volumen 21, número 4.



*A los que ya no están,*



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN. MICROSCOPIOS DE PROXIMIDAD: EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS.....</b>	<b>15</b>
1.1. DESCRIPCIÓN HISTÓRICO-CIENTÍFICA .....	15
1.2. BIOFÍSICA.....	20
1.3. MICROSCOPIOS DE PROXIMIDAD: UNA POTENTE HERRAMIENTA .....	21
1.4. EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS .....	24
1.4.1. <i>Fuerzas de interacción punta-muestra</i> .....	27
1.4.2. <i>Modos de operación</i> .....	30
1.4.2.1. Modo de contacto .....	31
1.4.2.2. Modos dinámicos .....	31
1.4.2.3. Modo de salto .....	36
1.4.3. <i>Resolución vertical y lateral</i> .....	39
1.5. RESUMEN .....	43
<b>2. EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS EN MEDIO LÍQUIDO.....</b>	<b>47</b>
2.1. EL AFM EN MEDIO LÍQUIDO .....	48
2.1.1. <i>Fuerzas de interacción en medio líquido</i> .....	48
2.1.2. <i>Modos de medida en medio líquido</i> .....	50
2.2. NANOINDENTACIONES REALIZADAS CON EL AFM.....	53
2.3. PICOS DE RESONANCIA EN EL ESPECTRO DE FRECUENCIAS .....	57
2.3.1. <i>Origen de los picos de resonancia</i> .....	57
2.3.2. <i>Eliminación de los picos de resonancia</i> .....	58
2.4. FUERZAS APLICADAS CON AM-DAFM EN MEDIO LÍQUIDO.....	61
2.4.1. <i>Planteación del problema</i> .....	61
2.4.2. <i>Modelo teórico</i> .....	65
2.4.3. <i>Aplicación experimental del método SPAM</i> .....	69
2.4.4. <i>Combinación de teoría y experimentos</i> .....	73
2.5. RESUMEN .....	80
<b>3. MICROTÚBULOS Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS .....</b>	<b>85</b>
3.1. EL CITOESQUELETO: MICROTÚBULOS .....	85
3.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS MICROTÚBULOS CON AFM EN MEDIO LÍQUIDO .....	89
3.3. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS MICROTÚBULOS .....	91
3.3.1. <i>Resultados experimentales</i> .....	92
3.3.1.1. Respuesta elástica lineal.....	92

3.3.1.2.	Respuesta elástica no lineal.....	95
3.3.2.	<i>Modelando la respuesta elástica del microtúbulo.....</i>	98
3.4.	INTERACCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS CON LA PROTEÍNA TAU.....	105
3.4.1.	<i>Interacción de tau con los microtúbulos .....</i>	106
3.4.2.	<i>Efectos de tau en las propiedades mecánicas de los microtúbulos .....</i>	110
3.5.	RESUMEN .....	114
<b>4.</b>	<b>MOTORES MOLECULARES. LA KINESINA.....</b>	<b>119</b>
4.1.	INTRODUCCIÓN A LOS MOTORES MOLECULARES .....	119
4.2.	ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA KINESINA.....	120
4.3.	MODELOS DEL MOVIMIENTO DE LA KINESINA .....	122
4.3.1.	<i>Modelo “inchworm”.....</i>	123
4.3.2.	<i>Modelo “hand-over-hand”.....</i>	123
4.4.	RECUBRIMIENTO DE MICROTÚBULOS CON KINESINA.....	126
4.4.1.	<i>Recubrimiento en condiciones de saturación.....</i>	128
4.4.2.	<i>Recubrimiento con motores individuales .....</i>	130
4.5.	MOBILIDAD DE MOTORES DE KINESINA INDIVIDUALES .....	132
4.5.1.	<i>Movilidad de motores individuales.....</i>	132
4.5.2.	<i>Movilidad en condiciones de saturación.....</i>	135
4.6.	RESUMEN .....	138
<b>5.</b>	<b>PROPIEDADES MECÁNICAS DE CÁPSIDAS VÍRICAS.....</b>	<b>143</b>
5.1.	FUNCIONES Y ESTRUCTURA DE CÁPSIDAS VÍRICAS.....	144
5.1.1.	<i>Ciclo biológico de un virus.....</i>	144
5.1.2.	<i>Arquitectura de las cápsidas .....</i>	145
5.1.3.	<i>Interacción entre capsómeros .....</i>	148
5.2.	CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS .....	152
5.3.	EL VIRUS DIMINUTO DEL RATÓN (MVM).....	154
5.4.	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL MVM POR AFM EN MEDIO LÍQUIDO.....	155
5.5.	PROPIEDADES MECÁNICAS DEL MVM.....	156
5.5.1.	<i>Un nuevo campo aún por explorar.....</i>	157
5.5.2.	<i>Resultados experimentales para cápsidas y viriones .....</i>	158
5.5.3.	<i>Modelo del comportamiento mecánico del MVM.....</i>	163
5.5.4.	<i>Implicaciones de los resultados.....</i>	167
5.6.	MANIPULACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DEL MVM.....	168
5.6.1.	<i>Elección de los mutantes y su resolución estructural por AFM en medio líquido .....</i>	169
5.6.2.	<i>Propiedades mecánicas de cápsidas y viriones mutados .....</i>	173
5.6.3.	<i>Implicación de las mutaciones en las propiedades mecánicas de los virus .....</i>	181
5.7.	RESUMEN .....	182
<b>6.</b>	<b>ACCIÓN DE LAS FUERZAS CAPILARES EN CÁPSIDAS VÍRICAS.....</b>	<b>187</b>
6.1.	MODELOS DE CÁPSIDAS VÍRICAS .....	188
6.2.	EFFECTOS DE LA DESECACIÓN.....	189
6.2.1.	<i>Cápsidas llenas de material genético.....</i>	189
6.2.2.	<i>Cápsidas vacías de material genético .....</i>	192

6.3.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS .....	195
6.3.1.	<i>Expulsión del material genético</i> .....	195
6.3.2.	<i>Fuerzas capilares</i> .....	197
6.4.	RESUMEN .....	199
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>203</b>
<b>I.</b>	<b>PREPARACIÓN DE SUPERFICIES Y MUESTRAS .....</b>	<b>211</b>
I.1.	PREPARACIÓN DE SUPERFICIES .....	211
I.1.1.	<i>Superficies de vidrio</i> .....	211
I.1.1.1.	Limpieza de las superficies de vidrio .....	212
I.1.1.2.	Superficies hidrofóbicas .....	212
I.1.2.	<i>Superficies de mica</i> .....	213
I.1.2.1.	Limpieza de las superficies de mica .....	214
I.1.2.2.	Poly-L-lysine .....	214
I.2.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	215
I.2.1.	<i>Experimentos con el virus MVM</i> .....	215
I.2.2.	<i>Experimentos con el fago <math>\Phi 29</math></i> .....	216
I.2.3.	<i>Experimentos con microtúbulos</i> .....	216
I.2.3.1.	Experimentos con microtúbulos y la proteína tau .....	216
I.2.3.2.	Experimentos con microtúbulos y la kinesina .....	217
<b>II.</b>	<b>CONCEPTOS GENERALES DE TEORÍA DE ELASTICIDAD</b>	
	<b>LINEAL .....</b>	<b>219</b>
II.1.	MÓDULOS ELÁSTICOS .....	219
II.2.	RESPUESTA ELÁSTICA DE UN SÓLIDO .....	222
II.2.1.	<i>Modelo de Hertz</i> .....	222
II.2.2.	<i>Modelo de cáscara elástica delgada</i> .....	223
	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>225</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>227</b>





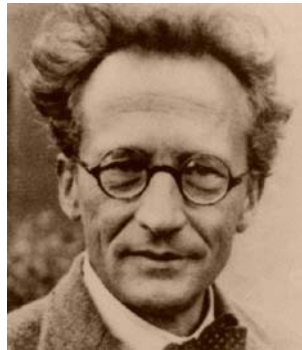
## **RESUMEN**

La presente tesis está enfocada a la caracterización mecánico-estructural de nanosistemas biológicos en su medio fisiológico mediante la aplicación del Microscopio de Fuerzas Atómicas. Esta memoria está dividida en 7 capítulos y 2 anexos. En el primero capítulo se hace una introducción al campo de la nanociencia, dentro del cual se puede situar este trabajo, y a los microscopios de proximidad como herramientas potentes para el avance de la nanotecnología. La técnica experimental utilizada a lo largo de este trabajo es básicamente el microscopio de fuerzas atómicas, por lo que el segundo capítulo está dedicado al funcionamiento y aspectos técnicos del microscopio de fuerzas en medio líquido. En el tercer capítulo se estudia la respuesta elástica de los microtúbulos a indentaciones radiales así como la posible influencia de la interacción de la proteína tau en la respuesta elástica de los mismos. Los resultados experimentales se comparan con las predicciones teóricas de modelos de elementos finitos. El cuarto capítulo está centrado en el estudio de motores moleculares y más concretamente de la kinesina. En el quinto capítulo comparamos las propiedades mecánicas de una cápsida vírica vacía con las que presenta el virión lleno de material genético con el objetivo de estudiar la influencia de éste en las propiedades mecánicas del virus. Los resultados experimentales son explicados mediante un modelo de elementos finitos. También investigamos la influencia de la mutagénesis dirigida sobre la modificación de las propiedades mecánicas del mismo virus. El capítulo seis está enfocado al estudio de las fuerzas capilares en las cápsidas nanométricas víricas durante los procesos de deshidratación. En el capítulo siete se reúnen las principales conclusiones recogidas en esta tesis. En el apéndice I se indican los protocolos empleados para la preparación de superficies y de muestras utilizadas. En el apéndice II se hace un breve repaso a conceptos generales de la teoría de elasticidad lineal. Por último, el manuscrito finaliza con un pequeño glosario de abreviaturas y la bibliografía utilizada.



## **CAPÍTULO 1:**

### **INTRODUCCIÓN. MICROSCOPIOS DE PROXIMIDAD: EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS.**



*"El principio de la ciencia, casi la definición, es el siguiente: La prueba de todo conocimiento es el experimento. El experimento es el único juez de la verdad científica", Richard P. Feynman*



## 1. INTRODUCCIÓN. MICROSCOPIOS DE PROXIMIDAD: EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS.

### 1.1. DESCRIPCIÓN HISTÓRICO-CIENTÍFICA

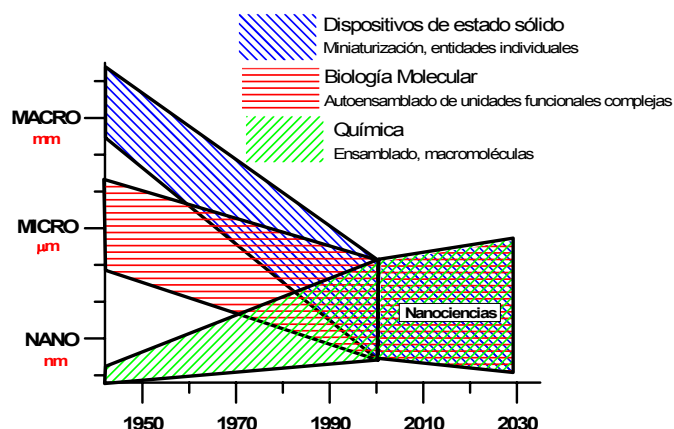
Actualmente, la ciencia se encuentra ante la revolución que constituye el estudio de lo muy pequeño, naciendo así un área de investigación que podemos denominar *nanociencia*, la cual según vaticinan algunos expertos nos conducirá a la tercera revolución industrial en el siglo XXI.

Richard Feynman, Premio Nobel de Física en 1965 por su contribución a la electrodinámica cuántica, es considerado el padre de la nanociencia a partir de su famoso seminario titulado *“There’s plenty of room at the bottom”* [Feynman. 1959], que impartió durante el encuentro anual de la American Physical Society (California Institute of Technology, Caltech, Pasadena, 29 de diciembre de 1959). En esta célebre conferencia, Feynman señaló: *“Me gustaría describir un campo en el cual muy poco se ha hecho, pero en el que se pueden hacer muchas cosas”... “De lo que quiero hablar es sobre el problema de manipular y controlar cosas a una escala pequeña”*. Seguidamente, preguntó a la audiencia si creían que era posible poder escribir los 24 volúmenes enteros de la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler. También habló de la capacidad de las células para almacenar información a pequeña escala, de la complejidad que encierran los procesos biológicos y de la miniaturización de las computadoras. Feynman afirmaba que la manipulación atómica y molecular no violaba ningún principio físico y el único problema era que aún no se había desarrollado el instrumental adecuado para llevar a cabo tales tareas. Fueron necesarios más de veinte años para que las ideas de Feynman llegaran a ser una realidad.

El prefijo nano, que deriva del griego *“nannos”* y significa “enano”, hace referencia a una medida de longitud. El nanómetro (nm) es la unidad de medida utilizada en esta escala y equivale a la millonésima parte de un milímetro, espacio en el

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

que caben 10 átomos de hidrógeno. La nanociencia es un campo multidisciplinar en el que coexisten muchas áreas del conocimiento como la física, química, biología, informática, electrónica, ciencias de los materiales, etc., que convergen en un punto común y cuyo objetivo es el conocimiento y caracterización de los fenómenos y propiedades de los materiales en la escala comprendida entre 1 y 100 nm (Fig. 1.1).



**Figura. 1.1.** Evolución de distintas áreas de la ciencia que trabajan en la macroescala (color azul), la microescala (color rojo) y la nanoescala (color verde) en función del tiempo. Podemos observar que alrededor del año 2000 estas tres grandes áreas convergen para dar lugar al nacimiento de la nanociencia.

El término *nanotecnología*, usado por primera vez por Norio Taniguchi en 1974 [Taniguchi. 1974], es utilizado indistintamente hoy en día junto con el de nanociencia, pero no hay que olvidar que la nanotecnología depende de la nanociencia. Mientras que la nanociencia se dedica a la caracterización de estructuras y materiales de muy diversa índole dentro de la nanoescala, la nanotecnología se dedica a la síntesis, diseño, manipulación, modificación y fabricación de estructuras, dispositivos y sistemas funcionales que presentan nuevas propiedades y funciones mediante el control de su forma y tamaño a escala nanométrica. Son muy diversos los campos de aplicación de la nanotecnología, entre los que podemos citar la electrónica, medicina, cosmética, tecnología de la comunicación, informática, medioambiente, industria textil, etc.

¿Por qué ha despertado tanto interés la nanociencia en el siglo XXI? La materia se comporta de forma diferente a nivel nanométrico, es decir, cuando pasamos de la macro o microescala, la cual está regida por los principios de la física clásica, a la nanoescala en la que la materia pasa a estar dominada por los principios de la mecánica

cuántica, por lo que propiedades como la conductividad eléctrica, el calor, el color, la temperatura de fusión, la elasticidad, la resistencia, etc., comienzan a depender críticamente del tamaño. En resumen, las propiedades físico-químicas de los materiales van cambiando a medida que su tamaño va disminuyendo.

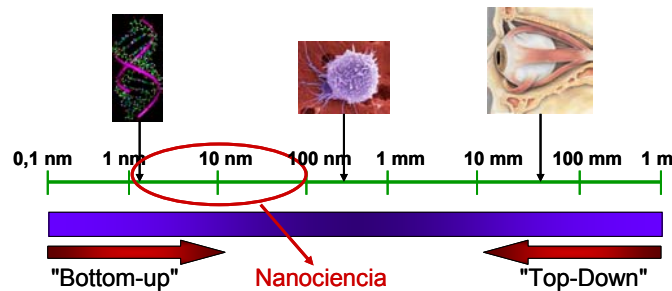
Aproximadamente, hasta las dos últimas décadas del siglo XX, la ciencia ha estado dominada por la microtecnología, donde se trabajaba en la escala del micrón para construir dispositivos como memorias, circuitos lógicos y de computación. La filosofía de trabajo en esta era estaba basada en la aproximación *top-down*, también conocida como miniaturización de los componentes, ya que consiste en ir construyendo dispositivos cada vez más pequeños, es decir, ir desde lo grande a lo pequeño, con el objetivo principal de aumentar el poder de cálculo de las computadoras. A lo largo de los años, el tamaño de estos dispositivos se ha ido reduciendo considerablemente, cumpliéndose aproximadamente la ley de Moore [Moore 1965], la cual predice que cada tres años el tamaño de los componentes en un circuito integrado se verá reducido en un 33%. En la actualidad se están diseñando circuitos electrónicos de tamaño nanométrico basados en moléculas individuales, nanotubos de carbono, puntos cuánticos y superestructuras magnéticas.

Desde las dos últimas décadas del siglo XX, la microtecnología está dejando paulatinamente un hueco a la nanotecnología. El paso de lo micro a lo nano ha supuesto también un cambio en la forma de trabajar, pasándose de la aproximación *top-down* a la aproximación *bottom-up*, basada en un diseño que parte de lo pequeño hacia lo grande, es decir, usar los átomos y moléculas como componentes elementales aprovechando sus propiedades de autoensamblado para así poder construir nanoestructuras o nanoobjetos con una forma y propiedades predeterminadas (Fig. 1.2).

El concepto de la aproximación *bottom-up* fue introducido en 1986 por Eric Drexler en su visionario libro “*Engines of Creation: The coming era of Nanotechnology*” [Drexler. 1986] y actualmente es también conocida como Nanotecnología Molecular [Drexler. 1992]. En su libro, Drexler habla de nanorobots y nanomáquinas ensambladores autoreplicantes que son capaces de manipular moléculas individuales para fabricar cualquier estructura, destruir virus y células cancerosas, reparar estructuras y células dañadas, etc. El concepto de los nanorobots que Drexler describe en su libro parece pura ciencia ficción. Aunque estos nanorobots o

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

nanomáquinas aún no han sido plenamente desarrollados por el hombre, sí podemos afirmar que existen en la naturaleza. El ejemplo más real de estos nanorobots lo encontramos en la biología ya que en cualquier proceso biológico intervienen diversos tipos de nanomáquinas con tamaños comprendidos entre uno y varias decenas de nanómetros que son capaces de transferir energía, autoensamblarse, autoreplicarse, aplicar fuerzas, transmitir señales, almacenar y transmitir información, etc.



**Figura. 1.2.** Esquema que muestra las dimensiones donde trabajan las aproximaciones “*bottom-up*” y “*top-down*”. De izquierda a derecha se representan: una molécula de ADN (2 nm), una célula hematíe (~7 µm) y un ojo humano (25 mm). La nanociencia se encuentra en la escala comprendida entre 1 y 100 nm.

Conocer el funcionamiento y propiedades que presentan estas sofisticadas bionanomáquinas es un gran reto para la nanotecnología, por lo que han despertado el interés de muchos científicos, que han visto la biología como una fuente de inspiración a la hora de construir nanosistemas. Como ya dijo Feynman, se trata de conocer e imitar a la naturaleza. Nace así la *nanobiotechnología*, que estudia el mecanismo y propiedades de los sistemas biológicos y su posible aplicación nanotecnológica. Vemos que la nanotecnología no sólo trabaja con la materia inerte, sino que también interviene en la manipulación molecular de la materia viva gracias al gran avance de la biotecnología y de la propia nanotecnología. La nanotecnología ofrece a la biología nuevas herramientas de trabajo y la biología ofrece a la nanotecnología apasionantes ejemplos de nanosistemas funcionales.

En la tabla 1.1 se especifican algunos de los grandes inventos y descubrimientos científicos que han contribuido al acercamiento de la ciencia hacia el conocimiento del nanomundo.



Año	Acontecimiento
1931	W. Knoll y E. Ruska desarrollan el primer microscopio electrónico de transmisión (TEM).
1937	M. Von Ardenne desarrollan el primer microscopio electrónico de barrido (SEM).
1947	J. Bardeen, W. H. Brattain y W. B. Shockley de los Laboratorios Bell desarrollan el primer transistor (premio Nobel de Física en 1956).
1953	Watson y Crick realizan el modelo de la estructura de doble hélice del ADN (premio Nobel de Medicina en 1962, junto con Wilkins).
1959	Richard Feynman imparte su famoso seminario <i>"There's plenty of room at the bottom"</i> .
1974	Norio Taniguchi usa por primera vez el término <b>nanotecnología</b> .
1975	A. Y. Cho y J. R. Arthur de los Laboratorios Bell desarrollan la técnica <i>Molecular Beam Epitaxy</i> (MBE).
1981	G. Binnig y H. Rohrer de los laboratorios de IBM inventan el microscopio de efecto túnel (STM) (premio Nobel de Física en 1986, junto con E. Ruska).
1985	Robert Curl, Harold Kroto y Richard Smalley descubren los fullerenos (premio Nobel de Química en 1996).
1986	Binnig, Quate y Gerber inventan el microscopio de fuerzas atómicas (AFM). E. Drexler publica "Engines of Creation: The coming era of Nanotechnology", donde plantea la aproximación bottom-up.
1990	D.M. Eigler y E.K. Schweizer mueven 35 átomos de xenón para escribir las siglas de la empresa IBM usando un STM a baja temperatura.
1991	Sumio Iijima descubre los nanotubos de carbón.
1998	C. Dekker y su grupo de la Universidad Tecnológica de Delft crean un transistor a partir de un nanotubo de carbono.
2000	Los laboratorios Luncet y Bell, junto con la Universidad de Oxford, crean el primer nanomotor de ADN.
2003	Se completa la secuencia del genoma humano.
2007	O. Custance y su equipo de la Universidad de Osaka consiguen la identificación de elementos químicos en átomos individuales usando un AFM.
2008	Craig Venter crea el primer genoma artificial.

**Tabla. 1.1.** Historia cronológica de los avances más importantes de y para la nanotecnología.

Desde la década de 1940 han sido muchos los físicos que se han interesado por el conocimiento de la base química de la información genética y de los problemas biológicos en general. Cabe citar aquí al biólogo y zoólogo James Watson y al biólogo y físico Francis Crick, quienes en 1953, con la ayuda de los datos cristalográficos por rayos-X del ADN obtenidos por Rosalind Franklin, presentaron el modelo de cadena de doble hélice para la estructura de la molécula de ADN [Watson 1953]. Este descubrimiento les valió, junto con Maurice Wilkins, el premio Nobel de Medicina en

1962. Otro gran físico involucrado en los problemas biológicos fue Schrödinger (premio Nobel de Física en 1933, junto con Paul Dirac), quien en 1944 publicó un ensayo titulado “*What is life?*” [Schrödinger 1944], fruto de una serie de conferencias que impartió en el Instituto de Estudios Avanzados del Trinity College de Dublín en 1943 donde expone un nuevo pensamiento científico y filosófico que aún perdura hoy en día. Schrödinger ya intuía la existencia del ácido nucleico, al que llamaba “cristal aperiódico” y también afirmaba que la Física sería útil a la Biología porque ofrecería una explicación unificada de la vida. Partiendo de la pregunta aparentemente ingenua, “*What is life?*”, Schrödinger propuso ideas que inspiraron a numerosos pensadores e impulsaron la reflexión sobre las relaciones entre Física y Biología. El impacto de este libro fue tal que científicos de diversas ramas del conocimiento se reunieron en 1993 para celebrar el quincuagésimo aniversario de la publicación de “*What is life?*” en el Trinity Collage de Dublín donde Schrödinger impartió sus conferencias [Murphy 1995].

### 1.2. BIOFÍSICA

Dado el alto interés científico en el conocimiento estructural y funcional de los sistemas biológicos, la nanotecnología no sólo se dedica al mundo abiótico, sino que también hay un gran campo abierto hacia los sistemas vivos, el mundo biótico. El estudio de los sistemas biológicos desde el punto de vista de la física es lo que se conoce como *biofísica*, siendo ésta una ciencia interdisciplinaria entre la física, biología, matemáticas, química, bioquímica, etc. En los últimos años ha ido creciendo el número de nuevos grupos de investigación que se han incorporado al campo de la biofísica.

La filosofía de trabajo impuesta por la aproximación *bottom-up* incluye estrategias de autoensamblado, lo que implica trabajar con moléculas individuales, esto es, a nivel de “*single molecule*” [Ritort 2006]. Trabajar con moléculas e incluso átomos a nivel individual ha sido posible gracias al gran avance tecnológico. Son varias las técnicas desarrolladas que permiten controlar y manipular con precisión nanométrica partículas individuales. Entre estas técnicas podemos resaltar: las pinzas ópticas [Ashkin 1987], que permiten atrapar moléculas individuales mediante un haz láser y medir fuerzas del orden del piconewton; pinzas magnéticas [Gosse 2002], cuya sensibilidad en

fuerzas puede ser superior a la alcanzada con las pinzas ópticas; el microscopio y espectroscopia de fluorescencia [Peterman 2004]; el microscopio de fuerzas atómicas [Binnig 1986], que permite visualizar partículas individuales de origen biológico en condiciones fisiológicas [Höber 2003] y realizar espectroscopia de fuerzas. La espectroscopia de fuerzas es utilizada para investigar la estructura y la función biológica de moléculas individuales mediante el estudio de las propiedades elásticas de partículas y el plegamiento de proteínas [Janshoff 2000].

El interés por el estudio de la materia biológica en el Laboratorio de Nuevas Microscopías (LNM) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) surgió hace ya más de 20 años, con la aplicación de la técnica del Microscopio de Efecto Túnel [Binnig 1982] al análisis estructural del bacteriófago  $\Phi 29$  [Baro 1985]. Años más tarde, esta línea de investigación se continuó con la aplicación del Microscopio de Fuerzas Atómicas al estudio de biomoléculas [Moreno Herrero 2003 Tesis Doctoral].

### **1.3. MICROSCOPIOS DE PROXIMIDAD: UNA POTENTE HERRAMIENTA**

Los microscopios de proximidad o microscopios de sonda, *Scanning Probe Microscope* (SPM), pueden ser considerados como la tercera generación de microscopios. Sus características y funcionamiento divergen mucho con respecto a los microscopios ópticos y electrónicos.

Mientras que, los microscopios ópticos y electrónicos usan radiación electromagnética, fotones y electrones respectivamente, para crear una imagen, los microscopios de proximidad utilizan las fuerzas de interacción existentes entre la muestra y una sonda muy afilada que va rastreando la superficie, por lo que se trata de microscopios de barrido. El microscopio óptico puede trabajar en medio líquido, lo que permite observar sistemas biológicos en su medio fisiológico, pero su resolución se encuentra limitada por la longitud de onda de la luz visible (comprendida entre 400 y 700 nm). Con el microscopio electrónico se consigue una mayor resolución que con el óptico, pero sólo opera en vacío y requiere que la muestra sea conductora por lo que las muestras que no lo son deben ser metalizadas. Estas dos condiciones excluyen al microscopio electrónico de su empleo para observar sistemas biológicos *in vitro*. El microscopio de proximidad en cambio, reúne las dos ventajas de cada uno de los

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

---

anteriores, ya que permite la observación de sistemas biológicos en su medio fisiológico consiguiendo a la vez una alta resolución. Otra característica a destacar es que con los microscopios de proximidad se obtienen imágenes en tres dimensiones (3D) gracias a que registran la topografía vertical. En la tabla 1.2 se indican las características más revelantes de cada uno de estos tres tipos de microscopios.

Microscopio	SPM	SEM	Óptico
Medio	Aire, vacío, líquido	vacío	Aire, vacío, líquido
Resolución X, Y	AFM: ~ 2-10nm STM: ~ 0.1 nm	5 nm	1 $\mu$ m
Resolución Z	AFM: < 0.1 nm STM: < 0.01 nm	Difícil	Difícil
Magnificación	1.000.000X	100.000X	1000X
Características de la muestra	No grandes cambios en altura	Cubiertas por un metal	No requiere

**Tabla. 1.2.** Comparación entre el microscopio de proximidad (SPM), electrónico (SEM) y óptico.

El origen de los microscopios de proximidad se remonta a la invención del perfilómetro (*stylus profiler*) por Schmalz en 1929 [Schmalz 1929]. Este perfilómetro utilizaba una sonda afilada al final de una palanca rígida de forma que la sonda rastreaba la superficie, igual que lo hace una aguja de un tocadiscos para leer sobre un vinilo, obteniendo así perfiles topográficos de la superficie. Más tarde, en 1972 R. Young perfeccionó el perfilómetro, al cual denominó topografímetro [Young 1972], introduciendo dos modificaciones: por un lado, el hecho de que la intensidad de emisión del campo eléctrico entre una sonda metálica y una superficie conductora dependa de la distancia sonda-superficie fue empleado para mantener la distancia sonda-superficie fija usando la intensidad de emisión del campo eléctrico como señal de realimentación y por otro lado, la utilización de cerámicas piezoeléctricas para que la sonda pudiese rastrear la superficie en las direcciones X, Y, Z, consiguiendo así imágenes de la superficie en 3D. El principal problema del topografímetro era el ruido vibracional, lo que ocasionaba inestabilidades en el circuito de realimentación.

En 1981 Gerd Binnig y Heinrich Rohrer de IBM se basaron en los métodos de Young para desarrollar el microscopio de efecto túnel, *Scanning Tunneling Microscope* (STM) [Binnig 1982], por el que obtuvieron el Premio Nobel de Física en 1986 (junto con E. Ruska). El STM utiliza una sonda o punta muy afilada terminada en unos pocos átomos, se aplica un voltaje a ésta y se acerca hasta la superficie a una distancia de

decenas de angstroms, distancia a la cual tiene lugar el fenómeno cuántico de la conducción túnel. La corriente túnel, utilizada como señal de realimentación para crear una imagen, varía exponencialmente con la distancia punta-muestra, lo que confiere la característica de ser un instrumento de medida altamente sensible. Para que el fenómeno de corriente túnel tenga lugar tanto la punta como la superficie deben de ser conductoras o semiconductoras. El STM ha sido el primer instrumento en crear imágenes en el espacio real de superficies con verdadera resolución atómica [Binnig 1983] y su aplicación es principalmente en condiciones de ultra-alto vacío (UHV). El hecho de requerir muestras y puntas conductoras o semiconductoras, impulsó a Binnig, a Quate y a Gerber a desarrollar otro microscopio que permitiera visualizar superficies no conductoras. Esto dio lugar, unos años más tarde, a la aparición del microscopio de fuerzas atómicas, *Atomic Force Microscope* (AFM) [Binnig 1986]. El AFM usa también una punta larga y afilada, colocada en el extremo de una micropalanca, cuyo radio de curvatura final suele ser de unas decenas de nanómetros. La punta o sonda se acerca a la superficie, produciéndose una fuerza de interacción entre punta y muestra que es utilizada como señal de realimentación. El AFM puede operar en aire, medio líquido y ultra-alto vacío, a la vez que permite trabajar tanto con superficies conductoras como aislantes.

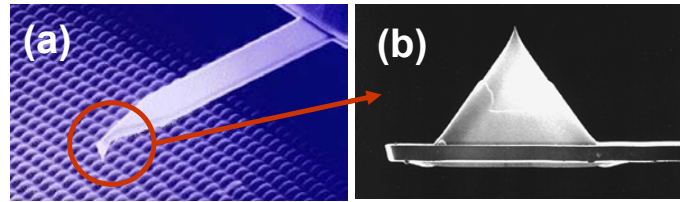
El nacimiento de los microscopios de proximidad ha proporcionado una herramienta clave para el desarrollo de la nanotecnología, ya que una cualidad que hace diferente a estos microscopios con respecto a los otros (óptico y electrónico) es que no sólo ofrecen la posibilidad de “ver” sino también de “tocar” y manipular la materia en la nanoescala así como de medir una gran variedad de propiedades físicas de las muestras. También es posible trabajar en un amplio rango de temperaturas, por lo que el SPM se ha convertido en una herramienta muy versátil con diversos campos de aplicación.

La técnica principal utilizada durante esta tesis ha sido el AFM, por lo que merecen una especial atención su funcionamiento, las fuerzas de interacción que intervienen, la resolución que puede alcanzar y los modos de operación.

#### 1.4. EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS

De forma muy general, podemos decir que el AFM construye una imagen topográfica de una superficie a partir de la medida de la fuerza de interacción existente entre una sonda o punta muy afilada y la superficie. El origen de las fuerzas de interacción es muy diverso y dependiendo de las características de la superficie y las condiciones en las que trabajemos (aire, vacío, líquido) algunas interacciones predominarán sobre otras.

La sonda o punta que se usa para rastrear la superficie suele medir varias micras de longitud y varias decenas de nanómetros de radio final. La punta se encuentra situada en el extremo de una micropalanca o fleje, también conocido como *cantilever*, con unas determinadas dimensiones y propiedades mecánicas (Fig. 1.3.a). Estas micropalancas están construidas de silicio o nitruro de silicio con una geometría rectangular o triangular. Se dispone de una gran diversidad de puntas, variando su tamaño, forma, materiales, etc. Es posible encontrar puntas con forma tetraédrica, cónica o piramidal (Fig. 1.3.b).

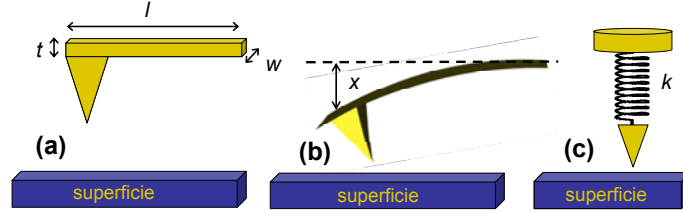


**Figura 1.3.** Imágenes de microscopía electrónica: (a) Una micropalanca rastreando una superficie. (b) Zoom de una punta piramidal de nitruro de silicio, la cual ha sido utilizada en muchos de los experimentos realizados a lo largo de esta tesis. [www.olympus.jp].

El comportamiento mecánico de la micropalanca se puede aproximar al de un muelle elástico que está regido por la ley de Hooke:

$$F = -kx \quad (1.1)$$

donde  $F$  es la fuerza recuperadora del muelle, que equivale a la fuerza de interacción punta-muestra;  $k$  es la constante de recuperación del muelle, que equivale a la constante elástica de la micropalanca y  $x$  es la deformación del muelle, que equivale al desplazamiento o flexión en la dirección vertical que sufre la micropalanca debido a las fuerzas de interacción. Por lo que, asumimos una respuesta elástica lineal para la micropalanca, en la que la fuerza necesaria para producir una determinada flexión es proporcional a dicha flexión (Fig. 1.4).



**Figura 1.4.** Dibujo esquemático de la similitud entre la micropalanca y un muelle elástico. (a) Micropalanca rectangular lejos de la superficie, donde  $l$ ,  $t$ ,  $w$  son la longitud, espesor y anchura respectivamente. (b) La micropalanca se acerca a la superficie produciéndose una flexión  $x$  desde la posición de reposo (línea punteada) proporcional a la fuerza de interacción  $F$ . (c) Un muelle elástico de constante de recuperación  $k$  se alarga o se contrae una distancia  $x$  en función de una fuerza  $F$ .

En este sentido, podemos decir que la micropalanca actúa como un sensor de fuerzas. La constante elástica de muelle  $k$  y la masa de la micropalanca  $m$  se relacionan con la frecuencia angular natural  $w_0$  mediante la siguiente expresión:

$$w_0 = \sqrt{\frac{k}{m}} = 2\pi f_0 \quad (1.2)$$

Para una micropalanca rectangular (como las utilizadas en esta tesis) sujeta a un extremo la constante elástica de muelle puede ser calculada a partir de sus dimensiones mediante la expresión:

$$k = \frac{E}{4} w \left( \frac{t}{l} \right)^3 \quad (1.3)$$

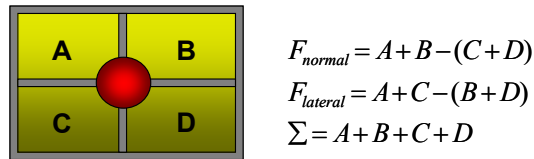
donde  $w$ ,  $t$ ,  $l$  son el ancho, espesor y longitud respectivamente y  $E$  es el módulo de Young del material.

Las propiedades mecánicas de las micropalancas deben intentar cumplir dos requisitos: por una parte, ser suficientemente flexibles para poder detectar pequeñas fuerzas, lo cual implica un bajo valor de la constante elástica de muelle  $k$  y por otro lado, tener una alta frecuencia de resonancia  $w_0$  para evitar ruidos mecánicos de baja frecuencia en las medidas y que la velocidad de barrido no se sea demasiado baja. La única forma de conseguir ambos requisitos es disminuyendo la masa de la micropalanca (Ec. 1.2). Esto ha sido posible gracias a las técnicas de microfabricación, que han permitido construir micropalancas con valores de la constante elástica de muelle  $k$  que oscilan entre 0.006 y 100 N/m y frecuencias de resonancia entre 13 y 500 KHz respectivamente. Las dimensiones de estas micropalancas están comprendidas

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

entre 30 y 40  $\mu\text{m}$  de ancho, 0.2 y 2  $\mu\text{m}$  de espesor y 100 y 200  $\mu\text{m}$  de longitud. El hecho de escoger uno u otro tipo de micropalanca para realizar un experimento depende crucialmente del modo de medida, la aplicación que se quiera realizar y del medio en el que se opere (aire, líquido o vacío).

Las fuerzas son medidas indirectamente a través de la flexión de la micropalanca. Para medir la flexión se usan comúnmente sistemas de detección óptica. El más solicitado por su simplicidad, es el conocido como “*laser beam deflection*” [Meyer 1988], que consiste en hacer incidir un haz láser sobre el extremo de la micropalanca donde se sitúa la punta, de forma que el haz láser reflejado por ésta incide sobre un fotodiodo dividido en cuatro sectores. La diferencia de intensidad de los sectores superiores e inferiores mide la deflexión vertical y es proporcional a la fuerza normal. La diferencia de intensidad entre los sectores laterales mide la deflexión de torsión y es proporcional a la fuerza lateral (Fig. 1.5). Las micropalancas suelen estar cubiertas de una fina capa de oro para que el láser se refleje sobre la cara superior.

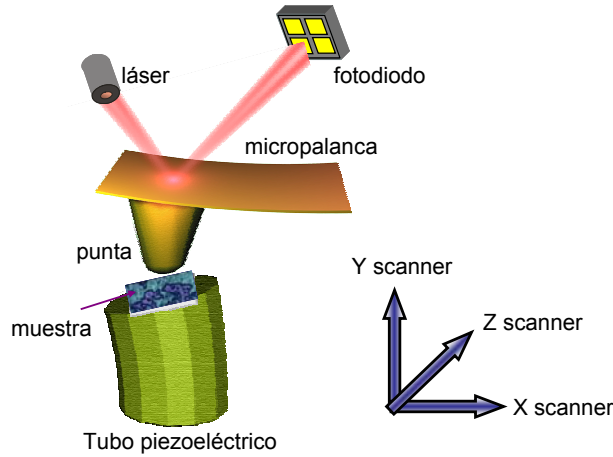


**Figura 1.5.** Esquema de un fotodiodo dividido en cuatro sectores. En ausencia de fuerzas de interacción, el láser está focalizado en el centro de los cuatro sectores. Las fórmulas de la derecha indican el valor de la fuerza normal, fuerza lateral y fuerza total respectivamente medidas por el fotodiodo.

El movimiento de la muestra en las direcciones X, Y, Z se realiza a través de un tubo piezoeléctrico segmentado en cuatro electrodos externos (para los movimientos X e Y) y uno interno (para el movimiento Z). Los elementos piezoeléctricos son materiales cerámicos que se expanden o contraen como respuesta a un voltaje aplicado. Los piezos de barrido  $x$  e  $y$  se encargan de realizar el movimiento de la muestra en las direcciones X, Y y el piezo  $z$  de expandirse o contraerse en la dirección Z. Para que la interacción punta-muestra sea constante a lo largo de todo el barrido, el sistema de realimentación calcula el voltaje exacto que hay que aplicar al piezo  $z$  para que éste se contraiga o dilate, según se requiera en cada caso. El valor de estos voltajes se calcula en cada uno de los puntos que constituyen la imagen y son utilizados para construir la topografía de la superficie. Para poder medir distancias en las direcciones X, Y y



alturas en la dirección Z, el sistema piezoeléctrico debe ser previamente calibrado<sup>1</sup>, ya que así conoceremos la relación de voltaje-movimiento en las direcciones X, Y, Z, la cual supondremos lineal cuando los voltajes aplicados no sean muy grandes. En la figura 1.6 se representa un esquema de los componentes esenciales para el funcionamiento del AFM: micropalanca y punta, sistema de detección óptica y tubo piezoeléctrico.



**Figura 1.6.** Dibujo esquemático de los componentes básicos de un microscopio de fuerzas: micropalanca con una punta en el extremo, sistema de detección óptica y tubo piezoeléctrico.

#### 1.4.1. Fuerzas de interacción punta-muestra

Para estudiar las fuerzas de interacción entre la punta y la superficie, consideramos el final de la punta y la superficie como dos conjuntos de átomos separados una distancia  $r$ , de forma que las fuerzas de interacción entre ambos derivan de un potencial de interacción intermolecular de tipo Lennard-Jones. Este potencial está constituido por fuertes interacciones repulsivas de corto alcance y por débiles interacciones atractivas de largo alcance y depende de la distancia  $r$  de la siguiente forma:

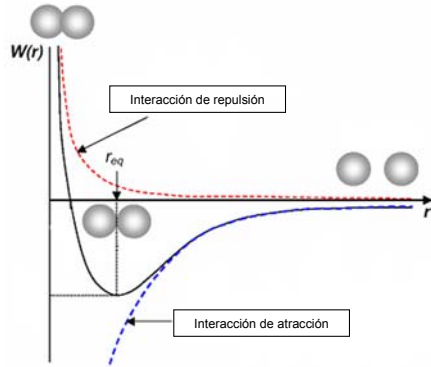
$$W(r) = W_{\text{repulsivo}} + W_{\text{atractivo}} = \frac{Ae^{-br}}{r} - \frac{\beta}{r^6} \approx \frac{\alpha}{r^{12}} - \frac{\beta}{r^6} \quad (1.4)$$

donde  $F(r)$  viene dada por:

<sup>1</sup> La calibración del piezo se ha realizado mediante la medida conocida de la altura entre planos atómicos del grafito para la dirección Z y mediante el uso de una retícula comercial de dimensiones conocidas en las direcciones X e Y.

$$F(r) = - \frac{\partial W}{\partial r} \quad (1.5)$$

La dependencia del potencial  $W$  con la distancia intermolecular  $r$  es:



**Figura 1.7.** Potencial de interacción intermolecular  $W$  en función de la distancia de separación intermolecular  $r$  (línea negra), constituido por interacciones repulsivas (línea a trazos roja) y por interacciones atractivas (línea a trazos azul).

El potencial de interacción presenta un mínimo de energía a la distancia intermolecular de equilibrio  $r_{eq}$ . A distancias muy cortas predominan las fuerzas repulsivas (positivas) y a distancias algo mayores predominan las fuerzas atractivas (negativas). A distancias más grandes ambas componentes tienden a cero. Cuando la micropalanca se acerca a la superficie las fuerzas de interacción hacen que ésta se flexione, de forma que las fuerzas son medidas indirectamente a través del reflejo del láser en el fotodiodo. Las fuerzas intermoleculares tienen su origen en las interacciones de origen electrostático y mecánico-cuántico. En ausencia de campos externos, las fuerzas dominantes son las siguientes:

- Fuerzas atractivas de largo alcance:

- *Fuerzas de van der Waals* (vdW): surgen de las interacciones intermoleculares y están siempre presentes, independientemente de la composición química de la superficie y del medio. Son fuerzas débiles que vienen regidas por el potencial interatómico de van der Waals  $W(r) = -C/r^6$ . En el caso en el que intervengan muchos átomos o moléculas, se puede asumir como correcto la aditividad de la fuerza entre ellos, donde se deduce que para una esfera y un plano (equivalente a la punta y a la superficie respectivamente), la fuerza atractiva de vdW entre ambos viene dada por:

$$F_{vdW} = -\frac{HR}{6r^2} \quad (1.6)$$

donde  $H$  es la constante de Hamaker (la cual depende de las propiedades del material y del medio),  $R$  el radio de la punta y  $r$  la distancia punta-muestra.

- *Fuerzas electrostática de Coulomb*: causadas por la presencia de cargas electrostáticas en la punta y en la muestra.

- *Fuerzas capilares*: originadas por la presencia de una fina capa de agua adsorbida sobre la superficie y la punta cuando se trabaja en aire, lo que induce a la formación de un menisco líquido entre punta y superficie cuando se aproximan provocando que la punta salte al contacto<sup>2</sup>. Cuando la micropalanca se separa de la superficie tiene que vencer una fuerza para poder romper el menisco líquido, lo que se traduce en una alta fuerza de adhesión. El valor de esta fuerza está en el rango comprendido entre 10 y 100 nN. Las fuerzas capilares y de adhesión no están presentes cuando se trabaja en medio líquido.

- Fuerzas repulsivas de corto alcance: su origen está en el principio de exclusión de Pauli.

- *Fuerzas de interacción química*: la energía de enlace químico decae exponencialmente con la distancia hasta alcanzar el régimen repulsivo, el cual es significativo sólo a distancias subnanométricas.

- *Fuerzas de contacto*: Aquí se incluyen las fuerzas normal y lateral a la superficie. Estas fuerzas son originadas por el contacto mecánico entre dos objetos elásticos, punta y muestra, que se deforman por la acción de la fuerza aplicada. Son varios los modelos desarrollados que relacionan la deformación con la fuerza aplicada entre una esfera y un plano. Los más utilizados son:

1) Modelo Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) [Derjaguin 1975]: es válido para contactos entre superficies con alto módulo de Young, baja fuerza de adhesión y radio de la punta pequeño. La relación entre fuerza aplicada y deformación viene dada por:

$$F = ER^{1/2}\delta^{3/2} - 4\pi R\gamma \quad (1.7)$$

---

<sup>2</sup> A este fenómeno se le conoce como "jump to contact" o "snap-in" y es una inestabilidad que se produce cuando  $dF/dz > k$  [Israelachvili 1991].

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

---

2) Modelo Johnson-Kendall-Roberts (JKR) [Johnson 1971]: es válido para contactos entre superficies con bajo módulo de Young, alta fuerza de adhesión y radio de la punta grande. La relación entre fuerza aplicada y deformación viene dada por:

$$\bar{\delta} = 3\left(\bar{F} + 2 + 2\sqrt{\bar{F} + 1}\right)^{2/3} - 4\left(\bar{F} + 2 + 2\sqrt{\bar{F} + 1}\right)^{1/6} \quad (1.8)$$

donde,

$$\begin{aligned} \bar{\delta} &= \delta / \delta_{ad}, \delta_{ad} = \left( \frac{\pi^2 R \gamma^2}{3 E^2} \right)^{1/3} \\ \bar{F} &= F / F_{ad}, F_{ad} = 3\pi R \gamma \end{aligned} \quad (1.9)$$

donde  $F$  es la fuerza aplicada,  $E$  el módulo de elasticidad efectivo,  $R$  el radio de curvatura efectivo,  $\delta$  la deformación y  $\gamma$  la energía de superficie.

Para altos valores de fuerza, todos estos modelos se aproximan a la ecuación de Hertz<sup>3</sup> [Hertz 1882]:

$$F = ER^{1/2} \delta^{3/2} \quad (1.10)$$

Cuando en la punta y muestra existen dominios magnéticos, aparecen interacciones magnéticas que dan lugar a las *fuerzas magnéticas*, fuerzas atractivas de largo alcance, que pueden ser utilizadas para construir mapas de dominios magnéticos. Esta técnica se conoce como microscopio de fuerzas magnéticas (MFM) [Sáenz 1987].

### 1.4.2. Modos de operación

Los distintos modos de operación utilizados en AFM dependen de las fuerzas de interacción que intervengan en ellos. Si predominan las fuerzas atractivas de largo alcance, estamos en el régimen de no contacto y si predominan las fuerzas repulsivas de corto alcance, estamos en el régimen de contacto. Los modos de operación se pueden dividir en estáticos, donde se encuentra el modo de contacto, *Contact Mode* (CM), y en dinámicos, *Dynamic Atomic Force Microscopy* (DAFM), donde se enmarcan el modo dinámico de modulación en amplitud y de modulación en frecuencia, en los que pueden intervenir fuerzas atractivas y repulsivas. El modo de salto, *Jumping Mode* (JM), se sitúa entre los modos estáticos y los dinámicos.

---

<sup>3</sup> El modelo de Hertz no tiene en cuenta las fuerzas de adhesión.

#### 1.4.2.1. Modo de contacto

El modo de contacto fue el primer modo de medida desarrollado para operar con el AFM [Binning 1986]. En este modo la punta se posiciona sobre la superficie a una distancia a la cual las fuertes fuerzas repulsivas dominan la interacción punta-muestra (región de la izquierda en la figura 1.7). La punta contacta con la superficie y la micropalanca se flexiona, ejerciéndose una determinada fuerza sobre la superficie. Esta fuerza se corresponde con la de un muelle elástico  $F = -kx$ , por lo que su valor depende de la flexión  $x$  y de la constante elástica de muelle  $k$  de la micropalanca. La deflexión detectada por el fotodiodo puede ser utilizada para formar la imagen topográfica de dos modos distintos: modo de altura constante, no se controla la fuerza aplicada sobre la superficie y modo de fuerza constante, sí se controla la fuerza aplicada.

A la fuerza aplicada en la dirección vertical a la muestra se le denomina fuerza normal. Además de esta fuerza, existe otra fuerza presente en CM, que es la fuerza de torsión de la micropalanca o fuerza lateral. La constante elástica de torsión  $k_{xy}$  de la micropalanca es  $\sim 40k_z$  [Carpick 1997], por lo que el valor de la fuerza lateral será mayor que el de la fuerza normal. Las fuerzas laterales derivan del barrido del piezo en el plano XY y de la propia fuerza normal cuando existe un ángulo entre la superficie y la micropalanca, por lo que la fuerza lateral va a depender del valor de la fuerza normal. La presencia de las fuerzas laterales es la principal desventaja de los modos estáticos, ya que pueden ser suficientemente altas como para deformar e incluso arrastrar o destruir muestras con bajo módulo de Young, como pueden ser las muestras biológicas o muestras débilmente adheridas al sustrato.

#### 1.4.2.2. Modos dinámicos

Los modos dinámicos [Martin 1987] surgen debido a la problemática creada por la existencia de las fuerzas laterales en CM. El objetivo es eliminar, o al menos minimizar, el efecto destructivo de las fuerzas laterales sobre las muestras. En los modos dinámicos [García 2002], la micropalanca oscila a su frecuencia de resonancia libre  $w_0$  excitándose con una señal periódica a la misma frecuencia. Los parámetros característicos del modo dinámico son la amplitud de oscilación, la frecuencia de resonancia y el desfase entre la señal excitadora y la respuesta de la micropalanca. El valor de estos parámetros es sensible a las fuerzas de interacción punta-muestra, por lo que pueden ser utilizados como señal de realimentación en el sistema.

La micropalanca se suele oscilar mediante excitación magnética o excitación acústica. En el método de excitación magnética [Han 1996] se aplica un campo magnético oscilatorio creado por una bobina. Su principal desventaja es que la micropalanca debe ser recubierta de algún material magnético. En el método de excitación acústica [Martin 1987] se excita un pequeño elemento piezoeléctrico laminar (*dither piezo*) que se adhiere a la micropalanca (Fig. 1.9), provocando así su oscilación. A lo largo de esta tesis hemos empleado el método de excitación acústica, ya que nos permite usar cualquier tipo de micropalanca comercial sin necesidad de magnetizarla.

Se han realizado diversas aproximaciones para intentar resolver la compleja ecuación de movimiento de la micropalanca bajo las fuerzas de interacción, tanto en aire [Butt 1995] como en líquidos [Sader 1998]. El modelo más simple, y por tanto más empleado, es el de un oscilador armónico no lineal amortiguado y forzado obligado a moverse en una sola dirección y con masa puntual [Chen 1994; Nony 1999; García 1999a]. Este modelo se conoce como “muelle de masa puntual” o “*point mass spring*”, cuya ecuación de movimiento viene dada por la siguiente expresión:

$$m\ddot{x} + b\dot{x} + kx = F_{ts} + F_0 \cos(\omega t) \quad (1.11)$$

donde  $k$  y  $m$  representan la constante elástica de muelle y la masa de la micropalanca respectivamente,  $F_0$  y  $\omega$  la amplitud y frecuencia de la señal excitadora respectivamente,  $b$  el factor de amortiguamiento,  $F_{ts}$  engloba a las fuerzas de interacción punta-muestra.

En ausencia de fuerzas de interacción, la ecuación 1.11 corresponde a la de un oscilador armónico forzado y amortiguado, cuya solución es:

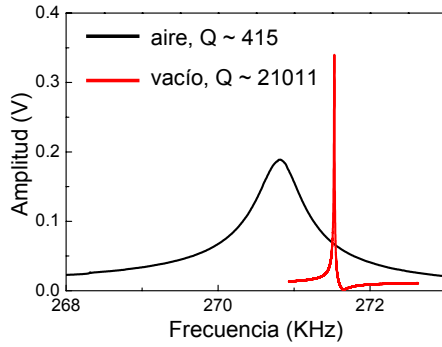
$$x(t) = Be^{-\alpha t} \cos(\omega t + \beta) + A \cos(\omega t - \phi) \quad (1.12)$$

El primer término corresponde al estado transitorio del sistema, el cual se hace nulo después de un tiempo irrelevante para nuestro sistema, por lo que éste pasará a depender sólo de la solución estacionaria, cuya amplitud y desfase con la señal excitadora vienen dados por:

$$A(\omega) = \frac{F_0 / m}{\left[ (w_0^2 - w^2)^2 + (ww_0 / Q)^2 \right]^{1/2}} \quad (1.13)$$

$$\tan \phi = \frac{ww_0 / Q}{w_0^2 - w^2} \quad (1.14)$$

donde  $w_0$  es la frecuencia de resonancia natural de la micropalanca y  $Q$  es el factor de calidad. Si el factor de calidad  $Q$  es suficientemente grande, como es el caso de operar en aire o en vacío, la frecuencia de resonancia se considera igual a la frecuencia natural de la micropalanca y  $Q = \frac{mw_0}{b}$ . En el caso de un oscilador poco amortiguado, el factor de calidad  $Q$  se puede aproximar a  $\frac{w_0}{\Delta w}$ . El factor de calidad  $Q$  depende inversamente del factor de amortiguamiento y proporciona una idea de la sensibilidad del sistema. La figura 1.8 muestran dos curvas de resonancia realizadas con la misma micropalanca ( $k = 40$  N/m) en aire (línea negra) y en vacío (línea roja), donde podemos observar que el factor de calidad  $Q$  es un factor 50 veces mayor en vacío que en aire.



**Figura 1.8.** Curvas experimentales de resonancia realizadas con una micropalanca de  $k = 40$  N/m en aire (línea negra) y en vacío (línea roja). Cuando se cambia de aire a vacío hay un pequeño desplazamiento de la frecuencia de resonancia y un gran estrechamiento de la curva, debido al aumento del factor de calidad.

La solución de la ecuación 1.11 depende del término no lineal  $F_{ts}$  que engloba a las fuerzas de interacción punta-muestra y cuya solución analítica no es inmediata. Para pequeños desplazamientos de la punta respecto a la posición de reposo  $Z_0$ , el comportamiento de la micropalanca se puede aproximar al de un oscilador armónico débilmente perturbado, cuya ecuación describe que cuando la distancia punta-muestra decrece aparecerán gradientes de fuerza que provocan una disminución en la amplitud y un desplazamiento del pico de la frecuencia de resonancia natural.

Dependiendo de los parámetros que se escojan como señal de realimentación disponemos principalmente de dos modos dinámicos:

- Modo dinámico de modulación de frecuencia (FM-DAFM):

En FM-DAFM [Albrecht 1991] la micropalanca está oscilando con una amplitud fija a su frecuencia de resonancia natural. Como la frecuencia de resonancia depende de la fuerza de interacción punta-muestra, a medida que la punta se acerca a la superficie se produce un desplazamiento de la frecuencia, de forma que la diferencia entre la

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

---

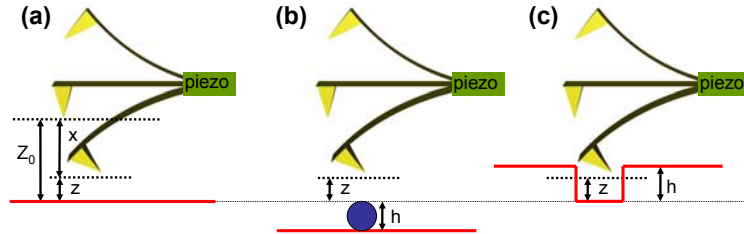
frecuencia de resonancia libre y la frecuencia de interacción a una cierta distancia de la superficie se mantiene constante mediante el sistema de realimentación. En este modo, generalmente actúan las fuerzas de largo alcance y es también conocido como no contacto, *non-contact AFM* (NC-DAFM). El FM-DAFM es usado principalmente en condiciones de vacío o UHV, donde el factor de calidad  $Q$  es muy alto (Fig. 1.8), lo que hace que el sistema sea muy sensible a pequeños cambios de la frecuencia de resonancia. Con este modo de medida se han obtenido imágenes con verdadera resolución atómica sin contacto mecánico con la muestra [Giessibl 1995]. Este modo ha sido recientemente utilizado como una técnica espectroscópica para la identificación química a nivel atómico de superficies, predominando en este caso las fuerzas de interacción de corto alcance [Sugimoto 2007]. También ha sido propuesto para trabajar en medio líquido con muestras biológicas, aunque su empleo en este campo no se encuentra aún muy extendido [Higgins 2005].

- Modo dinámico de modulación en amplitud (AM-DAFM):

Este modo dinámico ha sido utilizado durante esta tesis, tanto en aire como en líquidos, por lo que requiere una mayor atención. A continuación vamos a exponer su funcionamiento general en aire y en el capítulo siguiente se indicarán las diferencias al trabajar en medio líquido.

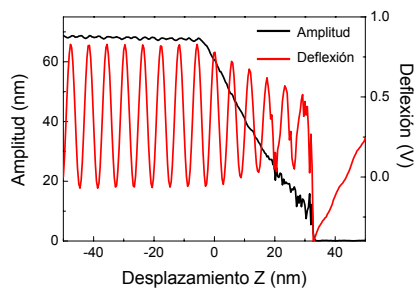
En AM-DAFM [Martin 1987] la micropalanca está oscilando a su frecuencia de resonancia libre con una determinada amplitud, típicamente entre 10 y 100 nm. La amplitud de oscilación depende críticamente de la fuerza de interacción punta-muestra, de forma que la amplitud disminuye a medida que la punta se acerca a la superficie. El valor de la amplitud a una determinada distancia de la superficie es usado como señal de realimentación, es decir, se mantiene constante a lo largo de la adquisición de la imagen topográfica. Esto equivale a mantener la distancia punta-muestra constante de forma que cuando la punta se encuentre con un cambio topográfico de altura  $h$  (Fig. 1.9), el sistema de realimentación aplicará el voltaje necesario al piezo  $z$  para que éste se contraiga o expanda, según corresponda, manteniendo siempre la separación punta-muestra constante.





**Figura. 1.9.** Esquema del modo dinámico AM-DAFM. (a) La micropalanca se encuentra oscilando y el sistema de realimentación mantiene la distancia punta-muestra  $z$  constante. (b) Si la micropalanca encuentra un objeto de altura  $h$ , el piezo se retrae esa misma altura. (c) Si la micropalanca encuentra una profundidad  $-h$ , el piezo se expande esa misma cantidad para mantener la distancia punta-muestra  $z$  constante.

Dependiendo del alcance de las fuerzas de interacción, aparecen dos estados de oscilación: uno en régimen de no contacto si dominan las fuerzas atractivas de largo alcance y otro en régimen de contacto cuando las dominantes sean las fuerzas repulsivas de corto alcance. Este último caso, es comúnmente conocido como contacto intermitente o *Tapping mode* [Zhong 1993; Hansma 1994; Putman 1994 (a)], ya que al final de cada ciclo de oscilación se produce contacto entre punta y muestra, es decir, la punta golpea la muestra en cada una de las oscilaciones que realiza la micropalanca. Ambos regímenes son dos soluciones distintas de la ecuación de movimiento de la micropalanca [García 1999a; García 2000] cerca de la superficie. El hecho de trabajar en el régimen atractivo o repulsivo va a depender de las propiedades físicas de la superficie, de las condiciones de operación elegidas por el usuario y del medio en el que se trabaje [Nony 1999; San Paulo 2000; de Pablo 2000a]. La figura 1.10 muestra una curva experimental de amplitud frente a distancia en aire a medida que la punta se acerca a la superficie.



**Figura. 1.10.** Curvas experimentales de amplitud y deflexión frente a distancia realizadas con una micropalanca de  $k = 0.75$  N/m en aire. Obsérvese en la curva de amplitud (línea negra) el aumento del ruido a partir de 26 nm y el salto al contacto producido a los 7 nm. La curva de deflexión (línea roja) muestra una disminución simétrica de la amplitud. Las curvas están inframuestreadas.

Observamos que cuando la amplitud es  $\sim 26$  nm se produce una inestabilidad debido a la transición del régimen de no contacto al régimen de contacto intermitente o *tapping* y a partir de aquí la curva de amplitud presenta un aumento del ruido. Cuando

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

---

la amplitud es  $\sim 7$  nm, la punta salta al contacto y la amplitud se reduce a cero. En este punto, la oscilación de la micropalanca no tiene suficiente energía para vencer la fuerza de adhesión.

Controlando el valor de la reducción de amplitud utilizada como señal de realimentación, se puede elegir trabajar en uno u otro régimen. La calidad de la imagen para el material biológico depende del régimen en el trabajemos. Para obtener imágenes de alta resolución en aire de muestras blandas es necesario trabajar en el régimen de no contacto [Moreno-Herrero 2000; San Paulo 2000], ya que trabajando en el régimen de contacto intermitente la calidad de las imágenes disminuye y las muestras pueden incluso ser dañadas irreversiblemente.

Los picos de fuerza atractivos y repulsivos ejercidos en cada ciclo de la oscilación en aire han sido calculados analíticamente [Hu 2007], indicando que los valores de los mismos no son constantes a lo largo del barrido y que los parámetros más decisivos en los picos de fuerza son la amplitud libre inicial y la reducción de amplitud utilizada como señal de realimentación.

El AM-DAFM es utilizado en medio ambiente y líquido. Además de obtener imágenes topográficas, es empleado también para construir mapas de contraste de la composición química en muestras heterogéneas usando el desfase producido entre la señal excitadora y la señal de respuesta de la micropalanca [Noy 1998]. Este tipo de mapas, denominados *phase imaging*, han tenido un gran potencial para estudiar diversas propiedades mecánicas de las superficies [Cleveland 1998; Tamayo 1998].

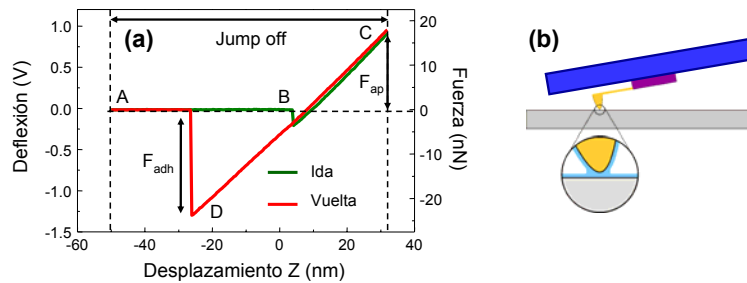
En todas las medidas realizadas en AM-DAFM con excitación acústica en aire a lo largo de esta tesis hemos trabajado siempre en el régimen de no contacto.

### 1.4.2.3. Modo de salto

El modo de salto o *jumping mode* (JM) [de Pablo 1998] surge, casi en paralelo, con otro modo conocido como *Pulsed Force Mode* (PFM) [Rosa-Zeise 1997], con la idea común de desarrollar un nuevo modo de medida que controle las fuerzas de interacción punta-muestra. De esta forma se minimizan las fuerzas normal y lateral sobre la muestra evitando así daños irreversibles que se producen en el modo de contacto y en el dinámico bajo ciertas condiciones.

En JM la flexión de la micropalanca es utilizada como señal de realimentación, lo que equivale a mantener constante la fuerza normal ejercida sobre la muestra. La

aplicación de este modo se realiza mediante la generación de una curva de fuerza frente a distancia ( $FZ$ ) [Cappella 1999] en cada uno de los puntos que constituyen la imagen. La figura 1.11.a muestra una curva experimental  $FZ$  realizada en aire con una micropalanca de  $k = 0.75 \text{ N/m}$ . Al comienzo de la curva  $FZ$  la muestra y la punta se encuentran lo suficientemente separadas como para que no haya fuerzas de interacción entre ellas (A). Seguidamente, el piezo  $z$  comienza a estirarse (línea verde) y la punta empieza a sufrir las fuerzas atractivas, generalmente fuerzas de van der Waals y capilares (Fig. 1.11.b), lo que provoca que la micropalanca salte al contacto (B).



**Figura 1.11.** (a) Curva experimental de fuerza frente a distancia ( $FZ$ ): (B) en el recorrido de la curva de ida (línea verde), el piezo  $z$  se estira, la micropalanca comienza a flexionarse y salta al contacto; (C) la punta contacta mecánicamente con la superficie hasta un valor máximo de deflexión o fuerza; (D) tras ello, en la curva de vuelta (línea roja) el piezo  $z$  se retrae y la punta tiene que vencer la fuerza de adhesión para volver a la posición inicial lejos de la superficie (A). (b) Dibujo del menisco líquido formado entre punta y superficie en aire, lo que provoca una fuerza de adhesión cuando la punta se separa de la superficie (línea roja en (a) zona D).

Una vez que la punta entra en contacto mecánico con la superficie, la micropalanca sigue flexionándose y por tanto aumentando la fuerza de contacto repulsiva hasta que la deflexión del láser alcance el valor seleccionado por el usuario (C). En este punto el sistema de realimentación es activado y el piezo  $z$  deja de estirarse. Tras un breve periodo de tiempo empieza a retraerse (línea roja) para separar la punta de la muestra. En este proceso de vuelta, la micropalanca debe vencer la fuerza de adhesión creada por el menisco líquido (D), por lo que la fuerza total en esta zona debe ser mayor que la fuerza de adhesión [Weisenhom 1989]. Una vez vencida esta fuerza, la punta vuelve a su posición inicial lejos de la superficie (A) y el piezo  $xy$  desplaza la muestra hacia el siguiente punto para realizar otra curva  $FZ$ , evitando así las fuerzas laterales de arrastre (Fig. 1.12).

De la figura 1.11 se deduce que la fuerza total  $F_{total}$  ejercida sobre la muestra es la suma de la fuerza aplicada  $F_{ap}$  más la fuerza de adhesión  $F_{adh}$ :

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

---

$$F_{total} = F_{ap} + F_{adh} \quad (1.15)$$

La fuerza aplicada o fuerza normal es controlada por el usuario, pero la fuerza de adhesión depende de las condiciones experimentales y de las propiedades de la muestra y la punta. Cuando existe un ángulo  $\theta$  entre la muestra y la punta aparece otra componente en la fuerza aplicada, se trata de una fuerza lateral derivada de la fuerza normal  $F_L = F_N \sin \theta$  y es aproximadamente entre un 10 y 30% del valor de la fuerza normal [Moreno-Herrero 2000]. Esta fuerza lateral esta presente en todos los modos de medida que impliquen contacto entre punta y muestra. A partir del voltaje aplicado al piezo z para que la micropalanca alcance una cierta flexión y del voltaje necesario para vencer la fuerza de adhesión, es posible obtener en tiempo real la imagen topográfica de una superficie y su correspondiente mapa de adhesión [de Pablo 1999].

Al realizar una curva *FZ*, los datos registrados son la deflexión recogida por el fotodiodo en voltios en función del desplazamiento del piezo z en la dirección Z. La deflexión debe ser convertida a fuerza haciendo uso del carácter elástico de la micropalanca mediante la ley de Hooke  $F = -kx$ . Por lo que necesitamos conocer la constante elástica de muelle  $k^4$  y el desplazamiento o flexión  $x$  de la micropalanca. El valor del desplazamiento  $x$  depende del tipo de micropalanca y de la posición del láser sobre la misma, por lo que es necesario determinar su factor de sensibilidad en cada experimento, es decir, la relación entre los nanómetros que la micropalanca se flexiona y el voltaje medido por el fotodiodo. Para ello se realiza una curva *FZ* sobre una superficie dura donde la flexión es lineal. En este caso la flexión en la región de contacto (zona C-D en la figura 1.11.a) coincide con el desplazamiento Z del piezo z y la pendiente de esta curva proporciona el factor de sensibilidad dado en nm/V. Multiplicando los valores de deflexión (V) por el factor de sensibilidad (nm/V) obtendremos el desplazamiento de la micropalanca  $x$  (nm). Finalmente, multiplicando el desplazamiento  $x$  por la constante de muelle  $k$ , obtendremos la conversión a fuerza:

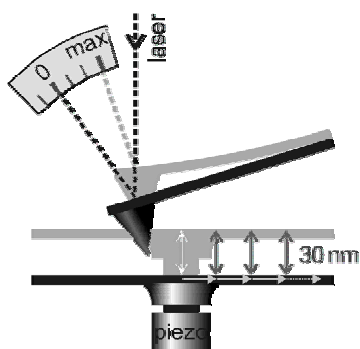
$$F(nN) = k(nN / nm) \times deflexion(V) \times sensibilidad(nm / V) \quad (1.16)$$

Las curvas *FZs* son ejecutadas mediante la programación de un algoritmo incorporado al software de control del microscopio. Los parámetros más importantes

---

<sup>4</sup> Las constantes elásticas nominales de las micropalancas son proporcionadas por el fabricante, pero deben ser calibradas por el usuario.

para el funcionamiento del JM son los siguientes: el valor de *set point* o deflexión, se traduce en la fuerza normal aplicada; *Jump off*, es la máxima separación entre punta y muestra, es decir, la cantidad del salto que realiza la punta; *Control Cycles*, controla el tiempo que se mantiene activado el sistema de realimentación; *Jump Sample*, controla el tiempo en el que se realiza cada curva FZ. La velocidad a la que se adquiere una imagen depende principalmente de los dos últimos parámetros.



**Figura 1.12.** Dibujo esquemático del funcionamiento de JM. En este caso el piezo z se estira 30 nm (*Jump off*) para realizar una curva FZ (dibujo gris) y la micropalanca se flexiona hasta alcanzar la posición “max” en el fotodiodo. Después del piezo z vuelve a contraerse 30 nm (dibujo negro) y el piezo xy mueve la muestra hacia la derecha para realizar otra curva FZ en el siguiente punto de la imagen. De esta forma se evitan las fuerzas laterales de arrastre.

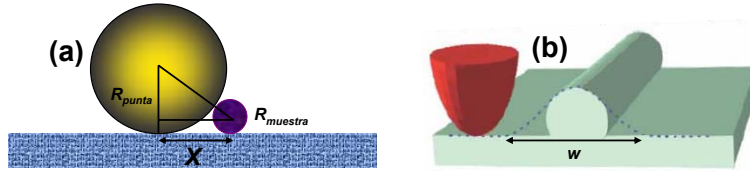
El JM es utilizado principalmente en medio líquido con muestras blandas o débilmente adsorbidas al sustrato, ya que al no existir grandes fuerzas de adhesión en líquidos se pueden utilizar micropalancas con bajos valores de constante elástica. Ambos factores hacen que la fuerza total sea minimizada (Ec. 1.15), siendo posible obtener imágenes de alta resolución sin provocar daños [Moreno Herrero 2003 Tesis Doctoral; Moreno Herrero 2004]. Trabajar en aire obliga a usar micropalancas con altos valores de constante de muelle para poder separar la punta de la superficie, debido a las grandes fuerzas de adhesión. Esto se traduce en la aplicación de altas fuerzas. Así, JM no se recomienda para el estudio de moléculas débilmente adsorbidas al sustrato en aire, siendo más adecuado la aplicación de AM-DAFM [Moreno-Herrero 2000].

#### 1.4.3. Resolución vertical y lateral

Un punto crucial de todo tipo de microscopio es la resolución espacial que puede alcanzar. Dado que el AFM proporciona una imagen en tres dimensiones, debemos distinguir entre resolución lateral (en la direcciones X e Y) y resolución vertical (en la dirección Z). La resolución lateral puede ser definida como la separación mínima entre dos puntos que son resueltos en una imagen. Esencialmente, viene dada por el radio final de la punta, el número de puntos de la imagen, la separación punta-muestra y la geometría del sistema. El número de puntos de la imagen puede ser

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

elegido adecuadamente en función del área de la misma. Para conseguir una buena resolución lateral se deberán usar puntas con radio final menor o igual que las características topográficas más pequeñas que se quieran resolver. Esto no siempre es posible ya que el radio de las puntas más finas disponibles comercialmente se sitúa entre 5 y 10 nm. El área de interacción entre punta y muestra es una fracción del radio final de la punta, de forma que varios átomos de la punta interaccionan simultáneamente con varios átomos de la muestra, dando lugar al efecto de dilación entre punta y muestra [Villarrubia 1997], que consiste en la influencia del tamaño y forma de la punta sobre las características topográficas resueltas en una muestra. Debido a este efecto las dimensiones laterales medidas en una imagen son mayores que las reales (Fig. 1.13).



**Figura 1.13.** Efecto de dilación punta-muestra en la resolución lateral. (a) Dimensiones de la punta ( $R_{punta} = 20$  nm) y de la muestra ( $R_{muestra} = 1$  nm) supuestas ambas esféricas. (b) Anchura aparente  $w$  (línea discontinua) del objeto resuelto por la punta.

De la figura 1.13 podemos deducir la anchura aparente de un objeto con geometría esférica de radio  $R_{muestra}$  mucho más pequeño que el radio de la punta  $R_{punta}$ , la cual para simplificar se ha supuesto esférica:

$$X^2 = (R_{punta} + R_{muestra})^2 - (R_{punta} - R_{muestra})^2 \rightarrow w = 2X = 4\sqrt{R_{punta}R_{muestra}} \quad (1.17)$$

Para una molécula de ADN con un diámetro nominal de 2 nm y una punta de radio típico de 20 nm, la molécula presentará una anchura aparente de  $w = 18$  nm. A partir de la ecuación 1.17 también podemos deducir el radio de la punta utilizada para medir un objeto si conocemos el radio nominal y la anchura aparente del mismo. La contaminación de las puntas también puede dar lugar a artefactos en las imágenes mostrando la superficie la geometría de la punta, lo que provoca artefactos geométricos como la duplicación de características topográficas a causa de puntas dobles.

La resolución vertical está limitada por la sensibilidad del sistema de detección óptica y por el ruido térmico de la micropalanca. La sensibilidad del sistema de detección depende principalmente del ruido electrónico y de las vibraciones mecánicas.

El ruido térmico da una medida del desplazamiento vertical de la micropalanca más pequeño que puede ser detectado por el sistema óptico. Cuando la deflexión es detectada mediante un sistema óptico, como en el método “*laser beam deflection*”, el ruido térmico viene dado por [Butt 1995]:

$$z = \sqrt{\frac{4k_B T}{3k}} \quad (1.18)$$

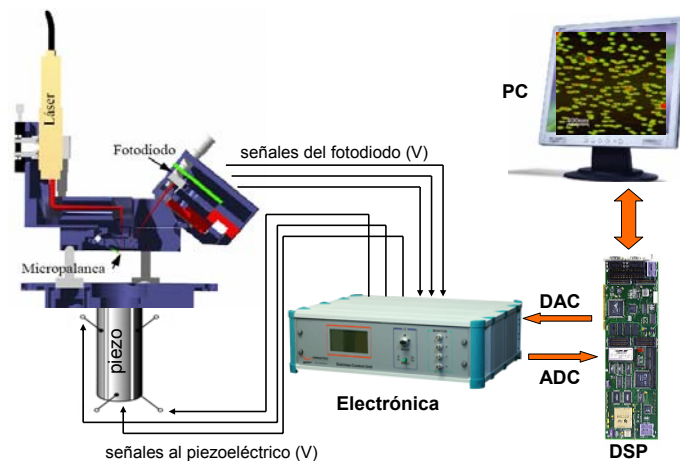
donde  $k$  es la constante elástica de muelle de la micropalanca,  $z$  es el ruido térmico,  $k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura del medio. Si trabajamos con una micropalanca de constante elástica de muelle de 0.05 N/m a temperatura ambiente (298 K), la resolución vertical es del orden de 3 Å. Para conseguir un ruido térmico más bajo hay que trabajar a temperaturas más bajas y con micropalancas más duras (Ec. 1.18). Cuando el factor de calidad  $Q$  es muy alto (en condiciones de UHV), la mayor parte del ruido se encuentra en la región espectral alrededor de la frecuencia de resonancia de la micropalanca. En estas condiciones la resolución vertical puede llegar a ser del orden del sub-angstrom [Giessibl 2000].

No se pueden dar números absolutos de la resolución alcanzada por el AFM ya que aparte de los factores mencionados anteriormente, los valores de la resolución dependen también de los medios en los que se trabaje (aire, líquido o vacío) y del régimen de medida (contacto o no contacto) empleado en cada caso. Más detalles pueden ser consultados en [Moreno Herrero 2003 Tesis Doctoral].

El microscopio de fuerzas atómicas utilizado en esta tesis se muestra en la figura 1.14, cuyo primer diseño fue realizado hace años en el Laboratorio de Nuevas Microscopías (LNM) junto con la empresa Nanotec Electrónica S.L, la cual actualmente comercializa este tipo de microscopios. El diseño del AFM inicial está en continuo desarrollo, adaptándose a las nuevas exigencias de los usuarios e incorporando nuevos y más sofisticados modos de medida así como la posibilidad de poder medir más señales en tiempo real. Este AFM consta de los siguientes elementos: la cabeza del microscopio, donde se encuentran el láser, el fotodiodo y la micropalanca; un tubo piezoeléctrico, para realizar el barrido; una electrónica, que recoge las señales provenientes de la cabeza y envía las señales correspondientes al piezoeléctrico; un Procesador Digital de Señales (DSP); un ordenador personal (PC), que es desde donde el usuario controla el microscopio mediante un software y en cuya pantalla se

## 1. Introducción: microscopios de proximidad

visualizan los datos. Un algoritmo controla el sistema de realimentación. En la tarjeta del DSP hay dieciséis convertidores de señales digitales a analógicas (DAC) que son los canales de salida de señales, los cuales controlan, por ejemplo, el voltaje que llega a los piezoeléctricos; y, dieciséis convertidores de señales analógicas a digitales (ADC) que son los canales de entrada de señales, como pueden ser la fuerza normal, fuerza lateral y la suma de ambas. El DSP trabaja en un rango de voltajes de  $\pm 15$  V, que puede ser amplificado mediante una ganancia a elección del usuario, de forma que a menor ganancia, menor capacidad de barrido y mayor resolución. En todas las medidas realizadas a lo largo de esta tesis se ha utilizado un piezoeléctrico con un diseño tubular concéntrico con dimensiones de 19 mm de diámetro y 65 mm de longitud, realiza barridos horizontales y verticales máximos de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  y  $6 \mu\text{m}$  respectivamente.



**Figura 1.14.** Principales componentes del sistema experimental utilizado en esta tesis: la cabeza del microscopio (se muestra un corte transversal), el tubo piezoeléctrico, la electrónica, el procesador digital de señales (DSP) y el ordenador personal (PC).

El sistema experimental se encuentra ubicado dentro de una caja protectora con el objetivo de mantener la temperatura constante en el interior de la misma y evitar así los problemas que puedan ocasionar pequeños cambios de temperatura en las medidas. A su vez, la caja se encuentra situada encima de una mesa antivibratoria para eliminar todas las vibraciones mecánicas procedentes del edificio y que puedan interferir en las medidas. La adquisición y procesamiento de los datos obtenidos con el microscopio se han realizado mediante el uso del programa WxSM [Horcas 2007], disponible de forma gratuita en la página web [www.nanotec.es](http://www.nanotec.es).



### 1.5. RESUMEN

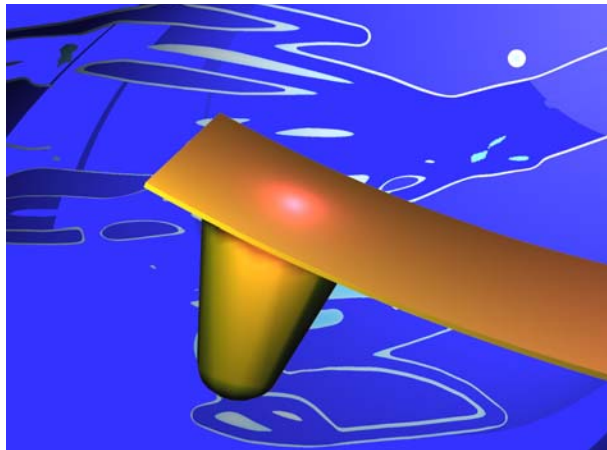
La nanociencia nace como un campo científico multidisciplinar en el que hay cabida para la física, química, medicina, biología, etc., y cuyo objetivo es estudiar la materia en la nanoescala (rango comprendido entre 1 y 100 nm). El gran avance de la nanociencia en las últimas décadas ha sido posible gracias al desarrollo de instrumentos cada vez más potentes, entre los que destacamos los microscopios de proximidad por su capacidad en la magnificación de las imágenes y su gran versatilidad.

En el campo de la biofísica las técnicas conocidas como “*single molecule*” tienen una importancia crucial, entre las que se encuentra el microscopio de fuerzas atómicas. El AFM utiliza la fuerza de interacción entre una punta muy afilada y la muestra para obtener un mapa topográfico de la misma. Las fuerzas de interacción pueden ser atractivas de largo alcance o repulsivas de corto alcance. El hecho de que dominen unas u otras fuerzas depende del medio en el que se trabaje (aire, líquido o vacío), de las características de la punta y de la muestra y del modo de operación que se emplee en cada caso (estático o dinámico). En el modo estático dominan las fuerzas repulsivas de corto alcance y en los modos dinámicos pueden dominar unas u otras fuerzas, ya que dependiendo de las condiciones de operación se puede elegir trabajar en un régimen de contacto intermitente (*Tapping*) o en régimen de no contacto. La existencia de fuerzas laterales es perjudicial para las muestras blandas biológicas, por lo que en este caso se debe elegir aquel modo de operación que las minimice, siendo los modos dinámicos más apropiados para trabajar en aire y el modo *Jumping Mode* para trabajar en medio líquido.



## **CAPÍTULO 2:**

### **EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS EN MEDIO LÍQUIDO**



*“...Haced los microscopios cientos de veces más potentes y muchos de los problemas de la biología resultarán más fáciles”, R. Feynman.*



## 2. EL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS EN MEDIO LÍQUIDO

Feynman, en su célebre discurso [Feynman 1959], no sólo especuló sobre lo concerniente a la materia inanimada, sino que también habló sobre problemas referentes a la materia viva: *“Es muy fácil responder a muchas de las preguntas fundamentales de los sistemas biológicos; sólo hay que mirarlos! Se verá el orden de las bases en la cadena, la estructura de los microsomas... Desafortunadamente, los microscopios actuales alcanzan un nivel que es todavía demasiado primitivo. Haced los microscopios cientos de veces más potentes y muchos de los problemas de la biología resultarán más fáciles”*.

El estudio de muestras de carácter biológico debe realizarse principalmente en medio líquido, ya que la vida empezó en el agua y es aquí donde se desarrollan la gran mayoría de los procesos biológicos. Actualmente, el microscopio de fuerzas atómicas constituye una herramienta fundamental para trabajar con muestras biológicas en medio fisiológico [Bustamante 1995; Kasas 1997]. El funcionamiento del AFM en medio líquido dista mucho de la forma de trabajar en aire o vacío debido, principalmente, al hecho de que la micropalanca se encuentra inmersa en dicho medio, lo que provoca que su dinámica y fuerzas de interacción punta-muestra sean distintas, lo cual tiene a su vez implicaciones en los modos de operación. Las muestras biológicas se caracterizan por ser material blando, por lo que es muy importante conocer las fuerzas aplicadas sobre las mismas para que conserven su integridad estructural y no sean dañadas durante las medidas. Las fuerzas aplicadas sobre las muestras pueden ser calculadas y controladas cuando se utilice JM, pero cuando se use AM-DAFM en líquidos el problema de las fuerzas aplicadas no es tan sencillo. Entre las aplicaciones del AFM, destacaremos la posibilidad que ofrece de realizar nanoindentaciones selectivas sobre objetos, las cuales pueden ser utilizadas para estudiar sus propiedades mecánicas.

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

### 2.1. EL AFM EN MEDIO LÍQUIDO

La mecánica de la micropalanca dentro de un fluido es mucho más compleja que en aire debido a la aparición de efectos hidrodinámicos. El término correspondiente a la fuerza amortiguadora  $b\dot{x}$  de la ecuación de movimiento (Ec. 1.11) cobra una mayor importancia por dichos efectos. La micropalanca debe mover el líquido que está a su alrededor, lo que provoca un aumento de la masa efectiva y consecuentemente una reducción de su frecuencia de resonancia (Ec. 2.1). El aumento del amortiguamiento hidrodinámico también provoca una disminución del factor de calidad  $Q$  del sistema.

O'Shea y Welland estimaron la masa efectiva y la frecuencia de resonancia en líquido para micropalancas rectangulares lejos de la superficie [O'Shea 1998]:

$$m_{ef} = nm_c + m_{punta} + 0.6n\rho_L(lw)^{3/2}$$
$$\frac{w_{0aire}^2}{w_{0liquido}^2} \approx 1 + 0.6 \frac{\rho_L}{\rho_C} \frac{\sqrt{lw}}{t} \quad (2.1)$$

donde  $n = 0.24$  para micropalancas rectangulares,  $m_c$  y  $m_{punta}$  son las masas de la micropalanca y de la punta respectivamente,  $\rho_L$  y  $\rho_C$  son la densidad del líquido y de la micropalanca respectivamente y  $w$ ,  $t$  y  $l$  son el ancho, espesor y longitud respectivamente. También estimaron el factor de amortiguamiento para una micropalanca rectangular:

$$b = n \left( 3\pi\eta l + \frac{3}{4} \pi w l \sqrt{2\rho_L \eta w_{liquido}} \right) \quad (2.2)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del líquido.

Para una micropalanca de silicio inmersa en agua,  $\rho_L/\rho_C = 0.43$ , con dimensiones  $l = 200 \mu\text{m}$ ,  $w = 20 \mu\text{m}$  y  $t = 0.8 \mu\text{m}$ , si usamos la ecuación 2.1 obtenemos

que  $\frac{w_{0aire}^2}{w_{0liquido}^2} \approx 21$ , por lo que la frecuencia de resonancia en agua es aproximadamente 5

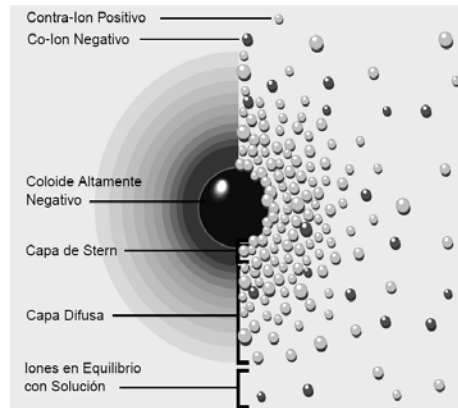
veces menor que la frecuencia de resonancia al aire.

#### 2.1.1. Fuerzas de interacción en medio líquido

En medio líquido las fuerzas de interacción entre punta y superficie se deben a las fuerzas de van der Waals (vdW) y a las fuerzas electrostáticas de la doble capa de Debye, *Electrostatic Debye Double Layer Force* (EDDL) [Israelachvili 1991].

Las fuerzas vdW para el caso de una esfera y un plano dependen fuertemente del valor de la constante de Hamaker  $H$  (Ec. 1.5). El valor de la constante de Hamaker en medio líquido es mucho menor que en aire o vacío, por lo que las fuerzas vdW en medio líquido están más atenuadas.

Las fuerzas EDDL provienen de la interacción entre las partículas rodeadas de la doble capa de Debye. Cuando una partícula cargada se encuentra en disolución, su carga eléctrica tiende a ser neutralizada por los iones presentes en la disolución de la siguiente forma: los contra-iones (iones de signo contrario a la carga de la partícula) forman una capa alrededor de la partícula cargada denominada *capa de Stern*. Otros contra-iones son atraídos por la carga de la partícula pero a la vez son rechazados por los propios contra-iones de la capa de Stern y por otros contra-iones vecinos que también intentan acercarse a la partícula. Este equilibrio dinámico da lugar a la formación de otra capa, la *capa difusa* de contra-iones. Los contra-iones de la capa de Stern y los de la capa difusa forman la *doble capa de Debye* (DDL). La concentración de contra-iones disminuye con la distancia hasta alcanzar un equilibrio (Fig. 2.1).



**Figura 2.1.** Dibujo esquemático que muestra la distribución de iones positivos (contra-iones) alrededor de una partícula cargada negativamente formando la *capa de Stern* y la *capa difusa*. Estas dos capas forman la *doble capa de Debye*. Nótese que la densidad de iones positivos va disminuyendo con la distancia hasta alcanzar un equilibrio con los iones negativos.

Cuando otra partícula se acerca, aparece una interacción electrostática debido a la superposición de la DDL de ambas partículas, dando origen a la fuerza EDDL. Para el caso de una esfera y un plano, la fuerza EDDL es:

$$F_{EDDL} = \frac{4\pi\sigma_s\sigma_t}{\epsilon\epsilon_0} e^{-r/\lambda_D} \quad (2.3)$$

donde  $\sigma_s$  y  $\sigma_t$  son las densidades superficiales del plano y la esfera,  $\epsilon$  y  $\epsilon_0$  la constante dieléctrica relativa del medio y la constante dieléctrica del vacío respectivamente,  $r$  es

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

---

la separación entre esfera y plano y  $\lambda_D$  es la longitud de Debye que representa el espesor de la doble capa de Debye.

La teoría DLVO [Derjaguin 1941; Verwey 1948] explica el equilibrio entre las fuerzas de atracción de van der Waals y las fuerzas de repulsión electrostáticas. La fuerza total entre una esfera y un plano viene dada por:

$$F_{DLVO} = \frac{4\pi\sigma_s\sigma_t}{\epsilon\epsilon_0} e^{-r/\lambda_D} - \frac{HR}{6r^2} \quad (2.4)$$

A medida que la distancia de separación va disminuyendo, es decir, los dos cuerpos se van acercando, la  $F_{DLVO}$  entre ambos aumentan. En la ecuación 2.4 observamos también que la  $F_{DLVO}$  disminuye exponencialmente con la distancia de Debye  $\lambda_D$ , la cual depende inversamente de la fuerza iónica [Israelachvili 1991], por lo que controlando la concentración de sales en la solución es posible controlar la fuerza de repulsión entre punta y muestra.

Hay que señalar que en medio líquido no aparecen las fuertes fuerzas capilares, ya que al estar la punta y la superficie inmersas en líquido no se produce la formación del menisco líquido entre ambas. Por otro lado, las bajas fuerzas atractivas de vdW en líquidos hacen muy difícil o casi imposible, como se explicará más adelante, poder operar en el régimen de no contacto del modo dinámico de modulación en amplitud, lo que obliga a operar en el régimen de contacto o contacto intermitente [Basak 2007 (a)].

### 2.1.2. Modos de medida en medio líquido

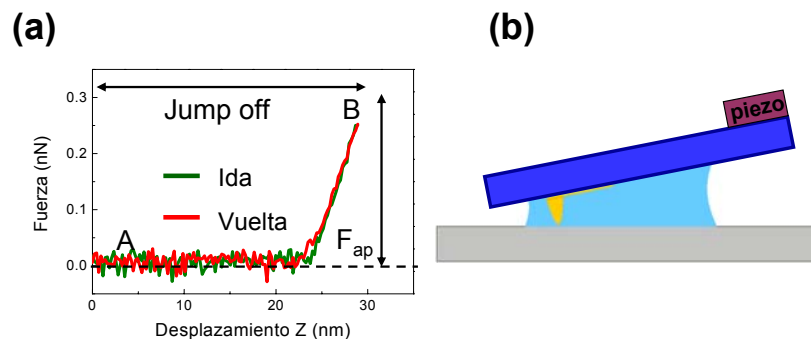
Para operar con el AFM en medio líquido vamos a trabajar con el mismo dispositivo experimental mostrado en la figura 1.16 con la salvedad de que ahora usaremos un porta-muestra especial diseñado con un pequeño borde para retener el líquido en su interior. Igualmente, emplearemos un porta-micropalanca específico, denominado celda líquida en el cual el pequeño piezoeléctrico utilizado para excitar a la micropalanca se encuentra alejado de ésta y aislado del medio líquido (Fig. 2.2.b).

Los modos de medidas de AFM más utilizados con muestras biológicas en medio líquido son el JM y el AM-DAFM. El CM no es indicado para trabajar con muestras biológicas por dos razones: por un lado, porque el material biológico se caracteriza por tener bajos valores del módulo de Young [Alberts 2002; Moreno Herrero 2003 Tesis Doctoral], es decir, se trata de materiales blandos y por otro lado, porque las muestras biológicas suelen estar adheridas débilmente a la superficie. Estas dos razones



son determinantes para dañar o destruir las muestras biológicas de forma irreversible bajo la acción de las fuerzas laterales de arrastre presentes en el CM.

El JM en medio líquido técnicamente funciona igual que en aire (apartado 1.4.2.3) pero como ya se comentó anteriormente este modo de medida es más apropiado para líquidos que para aire. En líquidos no están presentes las fuerzas capilares que generan las fuerzas de adhesión, por lo que la fuerza total será aproximadamente igual a la fuerza aplicada (Ec. 1.18), la cual depende de la constante de elástica de la micropalanca y de la deflexión o valor de *set point* impuesto por el usuario. Esto permite aplicar fuerzas del orden de decenas de piconewtons. La figura 2.2 muestra una curva experimental de fuerza frente a distancia realizada en medio líquido con una micropalanca de 0.05 N/m.



**Figura. 2.2.** (a) Curva experimental de fuerza frente a distancia donde observamos la ausencia de fuerzas capilares en la curva de ida y de fuerzas de adhesión en la curva de vuelta, ya que tanto la punta como la muestra están inmersas en medio líquido (b).

La falta de fuerzas de adhesión significativas permite aplicar un salto a la micropalanca (*Jump off*) mucho menor que en aire para que la punta se separe de la superficie (comparar *Jump off* en las figuras 1.12 y 2.2), lo que implica que el tiempo de adquisición de la imagen será menor que en aire. Dado que la adhesión es mínima, se podrán utilizar micropalancas con constantes elásticas más bajas que las empleadas en aire, lo que permite también reducir la fuerza aplicada. En la figura 2.2.a observamos que la fuerza máxima aplicada es menor de 300 pN, valor inferior al límite que provoca deformaciones irreversibles sobre muestras biológicas [de Pablo 2003; Ivanovska 2004]. Los mapas de adhesión obtenidos en medio líquido son útiles para estudiar interacciones entre biomoléculas funcionalizando la micropalanca [Willemsen 2000]. Recientemente el JM ha sido usado para obtener imágenes de moléculas de

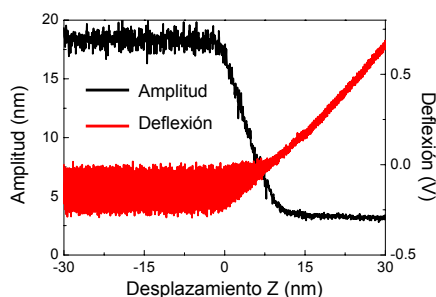
## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

avidina sobre mica sin contacto mecánico con la muestra en medio líquido empleando el valor de la fuerza EDDL como señal de realimentación [Sotres 2007].

El AM-DAFM ha sido el método más empleado para trabajar en medio líquido [Hansma 1994; Putman 1994 (a)], con el que se han obtenido importantes resultados sobre la estructura de biomoléculas en medio fisiológico [Möller 1999; Kienberger 2003]. Pero el funcionamiento de AM-DAFM en medio líquido es mucho más complejo que en medio ambiente debido a varios factores:

- El amortiguamiento de la micropalanca debido al líquido que la rodea hace que aparezcan efectos hidrodinámicos importantes.
- El método de excitación acústica en líquidos hace oscilar tanto a la micropalanca como a la celda líquida lo que provoca la aparición de múltiples picos de resonancia en el espectro de frecuencias.
- La imposibilidad de trabajar en el régimen de no contacto da lugar a fuerzas de contacto no controladas sobre las muestras cuyo cálculo no es trivial.

En las curvas de amplitud frente a distancia en líquidos (Fig. 2.3) no aparece la inestabilidad observada en el mismo tipo de curvas en aire (Fig. 1.11), lo que indica que no existe la transición del régimen de no contacto al régimen de contacto.



**Figura. 2.3.** Curvas experimentales de amplitud (color negro) y deflexión (color rojo) frente a distancia realizadas con una micropalanca de 0.03 N/m en medio líquido. Nótese la disminución asimétrica de la amplitud mostrada en la curva de deflexión. Las curvas mostradas están inframuestreadas.

Las fuerzas de vdW en líquidos son atenuadas, lo que produce una reducción del mínimo de la función del potencial de interacción (Fig. 1.7). Esto provoca que el límite entre el régimen de no contacto y de contacto no esté definido, por lo que al trabajar con AM-DAFM en líquidos la punta está en contacto intermitente (*Tapping mode*) con la muestra. En [Moreno Herrero 2004] se compara la aplicación de los modos de medida CM, JM y AM-DAFM en líquidos con muestras biológicas, concluyendo que el uso de CM es sólo recomendable para muestras estables que tienen un gran área de contacto con la superficie, por ejemplo los cristales de proteínas [Müller 1995; Müller 1999]. Para

el resto de biomoléculas, el modo más invasivo es el CM, debido a las fuerzas laterales, mientras que el menos invasivo es el JM. Las fuerzas normales y laterales aplicadas con AM-DAFM son menores que con CM pero mayores que con JM, por lo que el empleo de AM-DAFM suele producir una reducción de altura para determinadas muestras [Moreno-Herrero 2002] o un daño irreversible para otras [Xu aceptado].

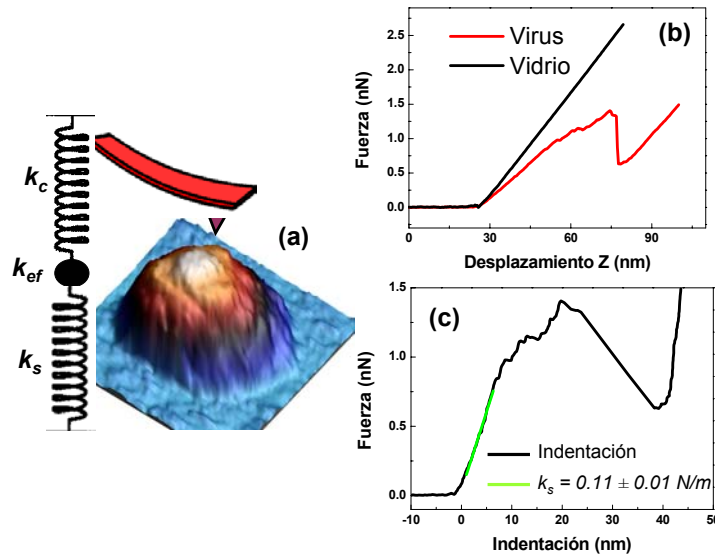
### 2.2. NANOINDENTACIONES REALIZADAS CON EL AFM

El AFM es una herramienta muy versátil que no sólo sirve para obtener imágenes topográficas, sino que también permite realizar una gran diversidad de medidas de ciertas propiedades físicas de las muestras como la conductividad eléctrica [Gómez-Navarro 2005 Tesis Doctoral], propiedades térmicas y magnéticas, energía de disipación [Anczykowski 1999], fuerzas de fricción, módulos elásticos, etc. También permite realizar espectroscopia de fuerzas, posibilitando el estudio de la interacción entre biomoléculas [Hinterdorfer 1996; Merkel 1999] y el plegamiento de proteínas [Carrion-Vazquez 1999; Oosterhelt 2000], técnica denominada como *pulling*, así como las propiedades mecánicas de nano-objetos [A-Hassan 1998], método denominado como *pushing*. En ambos casos, se trata de realizar nanoindentaciones selectivas sobre las muestras. Una nanoindentación consiste en una curva de fuerza frente a distancia de forma controlada, donde para el caso de *pulling* es importante la curva de vuelta, es decir, cuando la punta se separa de la muestra ejerciendo una fuerza de estiramiento (*stretching*) y para el caso de *pushing* es importante la curva de ida, es decir, cuando la punta contacta con la muestra ejerciendo una fuerza de compresión (*compressive*).

El estudio de las propiedades elásticas lineales y no lineales de biomoléculas se realiza mediante nanoindentaciones (*pushing*). Cuando realizamos una nanoindentación sobre una muestra o superficie, la respuesta de éstas a una fuerza aplicada puede ser lineal o no lineal (ver apéndice II). Si la respuesta a la fuerza aplicada no es lineal, es decir, la punta no sigue el movimiento de la muestra, como es el caso de las nanoindentaciones realizadas sobre células [Radmacher 1996] y membranas [Gueta 2006], el comportamiento mecánico del sistema puede ser descrito según el modelo de Hertz de contactos mecánicos elásticos [Hertz 1882]. Sin embargo, si la respuesta a la fuerza aplicada es lineal, el comportamiento mecánico del sistema puede ser descrito según el modelo de cáscara elástica delgada [Landau 1986], donde se predice que la

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

fuerza depende linealmente de la deformación hasta indentaciones del orden del espesor de la pared. Este modelo se aplica a aquellos sistemas denominados como “cáscara delgada” o “*thin shell*”. Este comportamiento elástico y lineal ha sido observado experimentalmente en sistemas que cumplen la condición de “cáscara delgada” [Ivanovska 2004; Schaap 2006; Carrasco 2008]. En los casos en los que la respuesta de un sistema elástico sometido a una fuerza sea lineal, el comportamiento mecánico de la micropalanca y del sistema será semejante al de dos muelles elásticos en serie (Fig. 2.4.a).



**Figura. 2.4.** Comportamiento mecánico elástico lineal. (a) Similitud entre el comportamiento de dos muelles elásticos en serie con el de la micropalanca y la muestra. (b) Curvas experimentales de fuerza frente a distancia sobre una superficie de vidrio (línea negra) y sobre una cápsida vírica (línea roja). (c) Curva experimental de nanoindentación sobre la cápsida calculada a partir de las curvas  $FZs$  en (b). La pendiente de la parte lineal de la curva (línea verde) proporciona el valor de la constante elástica de la muestra  $k_s$ .

En la figura 2.4.b se muestran dos curvas  $FZs$ , una realizada sobre una superficie de vidrio (línea negra) y la otra sobre una cápsida vírica (línea roja). Para la obtención de una curva  $FZ$  sobre la cápsida procedemos de la siguiente forma: cuando la partícula es localizada con el microscopio, se coloca en el centro de la imagen y el barrido del piezo en la dirección Y es interrumpido y ahora sólo barre una única línea, evitando así problemas con la deriva térmica. En esta posición el barrido del piezo en las direcciones X e Y se detiene, aplicándose un voltaje rampa al piezo en la dirección Z desde una distancia predefinida por el usuario. La deflexión recogida en voltios debe

ser convertida a unidades de fuerza (apartado 1.4.2.3). Normalmente cada curva  $FZ$  es muestreada usando entre 3.000 y 10.000 puntos a 15 KHz, y a su vez, cada punto es promediado 30 veces.

Observamos que la curva  $FZ$  realizada sobre la superficie de vidrio presenta un comportamiento lineal, mientras que la curva  $FZ$  sobre la cápsida vírica presenta un comportamiento lineal hasta alcanzar una fuerza de  $\sim 1$  nN. A partir de aquí encontramos un comportamiento no lineal seguido de la rotura total de la cápsida. Existe una gran diferencia entre las pendientes de ambas curvas, siendo mayor la pendiente sobre el vidrio, ya que su módulo de Young (70 GPa) es mucho mayor que el de las cápsidas víricas ( $\sim 2$  GPa). Si tomamos la curva  $FZ$  realizada sobre la cápsida hasta  $\sim 1$  nN de deformación lineal, la pendiente de esta recta es la medida de la constante elástica de muelle efectiva  $k_{ef}$  del sistema planteado en la figura 2.4.a, por lo que conociendo  $k_{ef}$  y la constante de muelle de la micropalanca  $k_c$ , podemos conocer la constante elástica de muelle o constante de rigidez axial de la muestra  $k_s$ :

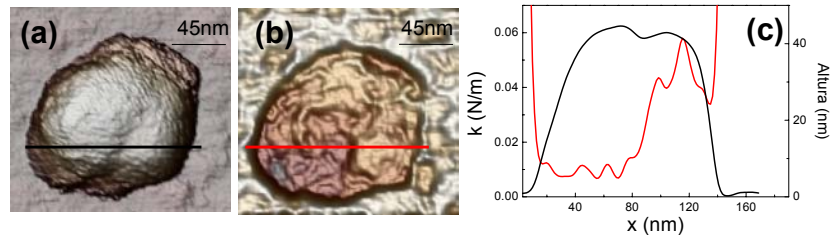
$$\frac{1}{k_{ef}} = \frac{1}{k_c} + \frac{1}{k_s} \Rightarrow k_s = \frac{k_c \times k_{ef}}{k_c - k_{ef}} \quad (2.5)$$

El valor  $k_s$  (N/m) da una medida de la elasticidad o *stiffness*, de la muestra.

Las curvas  $FZs$  sobre las muestras y sobre la superficie (Fig. 2.4.b) son realizadas normalmente en medio líquido, por tratarse de muestras biológicas. Dado que el modo de medida JM realiza curvas  $FZs$  en cada uno de los puntos que constituyen la imagen, desarrollamos, junto con Nanotec Electrónica S.L, un método adicional para obtener mapas de elasticidad. El algoritmo fue implementado en el software para que funcionara simultáneamente con el modo JM. El método desarrollado trabaja de la siguiente forma: en cada punto de la imagen ejecuta una curva  $FZ$  (normalmente, con una fuerza limitada a 100 pN para prevenir daños en la muestra), el software realiza un ajuste lineal de la curva de vuelta sobre la parte lineal del contacto, es decir, cuando la punta empieza a separarse de la superficie. El número de puntos, desde el último punto de realimentación, para realizar el ajuste lineal es elegido por el usuario. Normalmente utilizamos  $\sim 10$  puntos. Cuando el software realiza el ajuste lineal de estos puntos, las pendientes calculadas en cada una de las curvas  $FZs$  son representadas en un mapa con un código de colores, obteniendo así un mapa de la distribución de elasticidad de la superficie. El mapa de elasticidad proporcionado por el

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

software está representado en voltios y a partir de él, la constante elástica de muelle de cualquier punto del mapa puede ser calculada (Ec. 2.5). Este método es sólo válido para muestras que presenten una respuesta elástica lineal. En la figura 2.5 podemos ver un ejemplo de la aplicación de este método sobre una cápsida vírica. Previamente, mediante la ejecución de varias curvas *FZs* aplicando fuerzas superiores a 100 pN, provocamos una rotura en la parte inferior de la estructura de la cápsida (Fig. 2.5.a). Esta rotura resultó en una disminución de la constante elástica de muelle en esta zona de la cápsida, como puede verse en la escala de colores del mapa de elasticidad (Fig. 2.5.b) y en el perfil topográfico representado sobre esta zona (Fig. 2.5.c). La constante elástica de muelle ha disminuido desde  $\sim 0.07$  N/m a  $\sim 0.01$  N/m.



**Figura 2.5.** (a) Mapa topográfico de una cápsida del fago T7 (b) Mapa de distribución de elasticidad de la misma cápsida. (c) Perfiles del mapa topográfico (línea negra) y del de elasticidad (línea roja) realizados sobre las líneas marcadas en ambas imágenes. Nótese la diferencia de elasticidad debido a una rotura en la cápsida.

La desventaja de este método es que el software no almacena las curvas *FZs* realizadas en todos los puntos, por lo que no podemos disponer de las curvas experimentales para visualizarlas de forma individual. Esta es una de las razones por las que el estudio de las propiedades mecánicas de biomoléculas desarrollado en esta tesis ha sido realizado normalmente mediante la obtención de curvas *FZs* individuales, las cuales son utilizadas para calcular las constantes elástica de muelle de sistemas elásticos, así como para el estudio de otros parámetros, como la fuerza límite de rotura. Recientemente, en el software WxSM [Horcas 2007] se ha implementado el modo conocido como *Force Volume* (FV), basado en *Pulsed Force Mode* [Rosa-Zeise 1997], el cual permite realizar mapas topográficos, de adhesión y de elasticidad simultáneamente y es posible registrar toda la curva *FZ* en cualquier punto de la imagen.

### **2.3. PICOS DE RESONANCIA EN EL ESPECTRO DE FRECUENCIAS**

El empleo de AM-DAFM con excitación acústica en líquidos está caracterizado por la aparición de múltiple picos en el espectro de resonancia [Han 1996; Schäffer 1996], algunos de los cuales son muy afilados y de amplitud superior al pico correspondiente a la frecuencia natural de resonancia. Este fenómeno, conocido como “bosque de picos” o *“forest of peaks”*, impide una correcta elección de la frecuencia de resonancia natural de la micropalanca [Revenko 2000]. Aunque el microscopio puede ser operado usando diversas frecuencias [Kokavecz 2007], el hecho de escoger la verdadera frecuencia de resonancia nos permite optimizar el valor de la fuerza de interacción punta-muestra y evitar así daños en las muestras durante las medidas.

El modo magnético [Han 1996] fue introducido para resolver estos problemas y consiste en aplicar un campo magnético alterno a la micropalanca previamente magnetizada. En este caso el espectro de frecuencias muestra un único pico de resonancia que se corresponde con la frecuencia natural de resonancia de la micropalanca. La desventaja de este método es el hecho de tener que cubrir la micropalanca con una película de material magnético lo que provoca: por un lado, un aumento del radio de la punta debido al material extra, que puede empeorar la resolución debido a los efectos de dilación [Villarrubia 1997] y por otro lado, la película magnética puede desprenderse de la micropalanca cuando ésta se sumerge en líquido contaminando la muestra. A pesar del problema del bosque de picos en el espectro que presenta el modo acústico, su simplicidad técnica hace que sea el método más empleado para trabajar con AM-DAFM en líquidos.

#### **2.3.1. Origen de los picos de resonancia**

Existen varias teorías acerca del origen de los picos de resonancia en la excitación acústica. Originariamente se pensó que los picos provenían de vibraciones acústicas presente en el líquido [Putman 1994 (a)], ya que la celda líquida también oscila. Por lo que la principal hipótesis han sido los modos hidrodinámicos del fluido que rodea a la micropalanca. En [Schäffer 1996], mediante el uso de un sistema similar a los de detección interferométrica, se dedujo que el espectro de respuesta en frecuencias obtenido al excitar la micropalanca era un producto del denominado “espectro del fluido excitado” y del espectro del ruido térmico de la micropalanca en líquido. El

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

“espectro del fluido excitado” es una medida del movimiento del fluido cerca de la micropalanca y depende del material de la celda líquida, del piezo y del fluido, mientras que el ruido térmico de la micropalanca en líquido depende de las propiedades físicas de ésta en el fluido. Según esta idea, el origen del bosque de picos debería estar en las resonancias de la celda líquida o del pequeño piezoeléctrico que se propagan en el medio líquido. En [Maali 2006] se propone un método para eliminar estos picos modificando el sistema utilizado en aire, en el cual el elemento piezoeléctrico se encuentra cerca de la micropalanca. Recientemente, se ha medido el “espectro del fluido excitado” [Kokavecz 2007], identificándose el origen del bosque de picos. Estos autores han establecido que la mayoría de picos espurios que aparecen en el espectro de frecuencias tienen su origen en las resonancias del elemento piezoeléctrico.

### **2.3.2. Eliminación de los picos de resonancia**

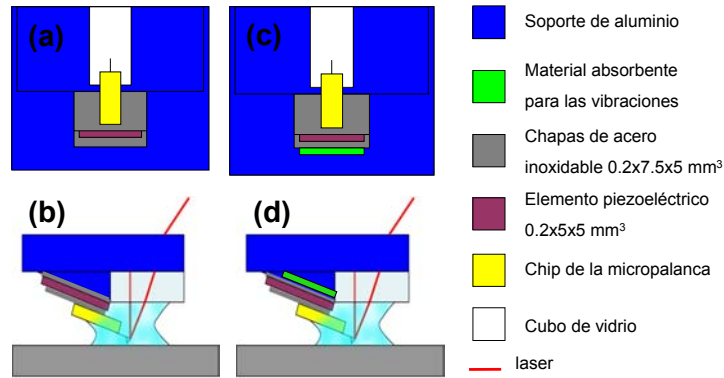
Por estas razones nos hemos centrado en resolver el problema de las resonancias provenientes del piezo para eliminar el bosque de picos y poder obtener un único pico de resonancia igual a los obtenidos mediante excitación magnética en líquidos. Para ello hemos incorporado un material especial en el montaje experimental del porta-micropalanca. Este material actúa como amortiguamiento para las resonancias del piezo. Comparando las curvas de barrido en frecuencias con y sin material, tanto en aire como en líquido, podremos determinar si dicha modificación elimina las vibraciones residuales.

Para todos estos experimentos empleamos una micropalanca rectangular [OMCL-RC800PSA] con los siguientes parámetros nominales: longitud 100  $\mu\text{m}$ , anchura 40  $\mu\text{m}$ , constante de muelle 0.73 N/m y frecuencia de resonancia en aire 71 KHz.

En la figura 2.6 se muestra el montaje experimental utilizado. En la figura 2.6.a observamos una vista superior del porta-micropalanca empleado, donde el piezo (color púrpura) se encuentra entre dos chapas de acero inoxidable a modo de “sándwich”. La figura 2.6.b representa un corte transversal del montaje de la figura 2.6.a en el que la micropalanca está inmersa en líquido. En la figura 2.6.c observamos una vista superior del porta-micropalanca donde el material absorbente para las vibraciones (color verde) está insertado entre la chapa de acero inoxidable y la estructura metálica, cerca del piezo para amortiguar las vibraciones residuales. Se trata de una arcilla blanda



insoluble en líquidos, denominada Rodico ®. La figura 2.6.d representa un corte transversal de la configuración de la figura 2.6.c en líquidos.



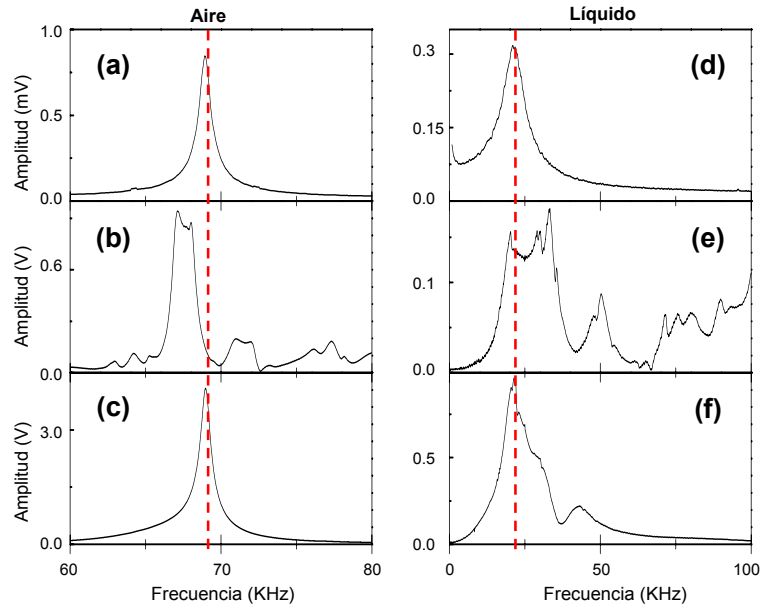
**Figura 2.6.** Dibujo esquemático del montaje experimental del porta-micropalanca: (a) vista superior sin material absorbente en aire, (b) corte transversal sin material absorbente en líquido, (c) vista superior con material absorbente (color verde) en aire, (d) corte transversal con material absorbente (color verde) en líquido.

En primer lugar registramos las curvas del espectro térmico y del barrido en frecuencias en aire mediante excitación acústica utilizando el montaje mostrado en la figura 2.6.a. El espectro térmico en aire muestra un pico de resonancia a 69 KHz con un factor de calidad de 123 (Fig. 2.7.a). La figura 2.7.b muestra la curva de barrido en frecuencias en aire, observándose algunos picos espurios. La aparición de picos de resonancia en el espectro de frecuencias en aire ha sido ya observada anteriormente [Putman 1994 (a)]. Para intentar eliminar los picos obtenidos en la curva de resonancia 2.7.b y mejorar la calidad del pico principal, utilizamos el nuevo montaje experimental (Fig. 2.6.c). Una curva de barrido en frecuencias en aire empleando este montaje es representada en la figura 2.7.c mostrando un claro pico de resonancia que coincide con el de 69 KHz encontrado en el ruido térmico (ver línea roja).

En segundo lugar representamos experimentos similares a los anteriores pero en líquidos. Primero, con el montaje tradicional sin material absorbente (Fig. 2.6.b) registramos el espectro térmico (Fig. 2.7.d). Observamos que tanto la frecuencia como el factor de calidad del pico han decrecido en comparación cuando la micropalanca está en aire debido al aumento del amortiguamiento hidrodinámico. Cuando se realiza un barrido en frecuencias con el montaje tradicional (sin material absorbente) aparece el típico bosque de picos de resonancia (Fig. 2.7.e) proveniente de las resonancias del piezo. Observamos que algunos de ellos son aún más afilados y de mayor amplitud que

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

el verdadero pico de resonancia de la micropalanca. Si realizamos el mismo barrido en frecuencias usando el montaje con el material absorbente en líquidos (Fig. 2.6.d), la mayoría de los picos de resonancia desaparecen (Fig. 2.7.f) y obtenemos un único pico en el espectro muy similar al encontrado en el ruido térmico (ver línea roja).



**Figura 2.7.** Curvas de resonancia en aire (columna izquierda) y en líquido (columna derecha). (a) espectro del ruido térmico en aire, (b) barrido en frecuencias sin material absorbente en aire, (c) barrido en frecuencias con material absorbente en aire, (d) espectro del ruido térmico en líquido, (e) barrido en frecuencias sin material absorbente en líquido, (f) barrido en frecuencias con material absorbente en líquido. La línea roja en ambos casos sirve para comparar la posición de los picos de resonancia del ruido térmico con los obtenidos en el barrido en frecuencias.

Si comparamos las figuras 2.7.b y 2.7.e, observamos que la cantidad de picos de resonancia en los espectros obtenidos es mucho menor en aire que en líquidos. Esto es debido a que los factores de calidad de los picos de resonancia del piezo ( $Q \sim 30$  y  $60$ ) son mucho menores que el factor de calidad del pico de resonancia de la micropalanca en aire ( $Q \sim 100$ ); pero en cambio, son mucho mayores que el factor de calidad del pico de resonancia de la micropalanca en líquidos ( $Q \sim 1$  y  $5$ ), por lo que los picos de resonancia del piezo en aire quedan atenuados. Comprobamos cómo el uso de un material amortiguador insertado cerca del piezo elimina el bosque de picos, tanto en aire como en líquidos, resultando en la obtención de un único pico de resonancia. La calidad del espectro de resonancia obtenido puede ser comparada con la obtenida mediante excitación magnética.

## 2.4. FUERZAS APLICADAS CON AM-DAFM EN MEDIO LÍQUIDO

El empleo de AM-DAFM para trabajar con muestras biológicas en medio líquido está ampliamente extendido pero aún existen muchas incógnitas sobre los valores de las fuerzas máximas aplicadas por la micropalanca sobre las muestras. En [Putman 1994 (a)] se predicen los valores de la fuerza promedio y fuerza máxima aplicada en líquidos, los cuales se calculan fácilmente mediante la deflexión de la micropalanca. Sin embargo, estos valores están subestimados.

Como hemos visto anteriormente, usar AM-DAFM en líquidos implica estar en contacto intermitente con la muestra, por lo que al final de cada ciclo de oscilación se ejerce un pico de fuerza sobre la muestra. Este pico debe ser minimizado, sobre todo cuando trabajemos con muestras biológicas, ya que fuerzas del orden de unos pocos nanonewtons pueden deformar irreversiblemente las muestras. Estos picos de fuerza también pueden proporcionar información sobre ciertas propiedades físicas de las muestras como la adhesión, elasticidad o viscoelasticidad [Magonov 1997; Tamayo 1997; Cleveland 1998; Giessibl 2003].

### 2.4.1. Planteación del problema

Desde el punto de vista cuantitativo se desconoce en detalle cómo las propiedades mecánicas de la micropalanca, las condiciones experimentales utilizadas en el modo dinámico o las propiedades físicas de las muestras pueden afectar al valor de los picos de fuerza. Por estas razones consideramos interesante indagar de forma más profunda en el análisis de los picos de fuerzas ejercidos sobre muestras blandas en líquidos.

Para ello vamos a trabajar con dos micropalancas de diferentes dimensiones, a las que denominamos *small lever* (SL) [BL-RC150VB] y *conventional lever* (CL) [OMCL-RC800PSA]. La tabla 2.1 recoge los parámetros nominales de ambas micropalancas así como los parámetros medidos experimentalmente, es decir, calibrados. Las constantes elásticas de las micropalancas son calibradas mediante el método de Sader [Sader 1999]. Las dos micropalancas son excitadas acústicamente mediante el uso de un pequeño piezoeléctrico aplicando una señal con una frecuencia igual a la encontrada en el pico de resonancia del ruido térmico en líquidos.

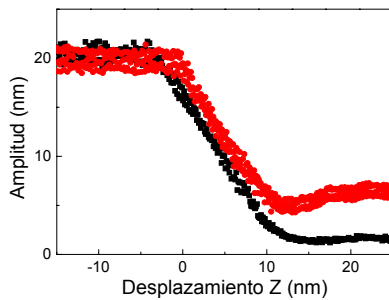
## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

Tipo de micropalanca	<i>Small lever</i> (SL)	<i>Conventional lever</i> (CL)
$L(\mu\text{ m}) \times W(\mu\text{ m}) \times T(\mu\text{ m})$	$60 \times 30 \times 0.18$	$200 \times 20 \times 0.8$
Altura de la punta ( $\mu\text{ m}$ )	7	2.9
Radio de la punta (nm)	30	20
Constante elástica nominal (N/m)	0.03	0.05
Constante elástica calibrada (N/m)	0.063	0.072
Frecuencia resonancia nominal aire (kHz)	37	18
Frecuencia resonancia calibrada aire (kHz)	43.6	20.1
Factor de calidad aire	41	53
Frecuencia resonancia líquido lejos de superficie (kHz)	9.3	6
Factor de calidad líquido lejos de la superficie	1.84	1.85
Frecuencia resonancia líquido cerca de superficie (kHz)	8.3	5.4
Factor de calidad líquido cerca de la superficie	1.02	0.47
Masa efectiva líquido lejos de la superficie (kg)	$1.9 \times 10^{-11}$	$5.2 \times 10^{-11}$
Masa efectiva líquido cerca de la superficie (kg)	$2.4 \times 10^{-11}$	$6.4 \times 10^{-11}$

**Tabla 2.1.** Dimensiones y parámetros característicos nominales y medidos experimentalmente para las micropalancas *small lever* (SL) y *conventional lever* (CL).

El primer objetivo es comprobar si es posible obtener imágenes de alta resolución sin inducir daños empleando AM-DAFM acústico con las dos micropalancas descritas antes. Para ello escogimos dos muestras biológicas cuya geometría y propiedades mecánicas son muy diferentes: los microtúbulos [Schaap 2006] y el bacteriófago  $\Phi 29$  [Ivanovska 2004].

Para el funcionamiento de ambas micropalancas en AM-DAFM líquidos empleamos una amplitud libre de oscilación de 20 nm (Fig. 2.8), donde el valor de amplitud utilizado como señal de realimentación fue el 65% y 82% de la amplitud libre inicial para SL y CL respectivamente. En ambos casos empleamos la mínima reducción de amplitud posible con el fin de aplicar la mínima fuerza sobre las muestras [Putman 1994 (a); Putman 1994 (b)].



**Figura 2.8.** Curvas experimentales de amplitud frente a distancia para CL (color rojo) y para SL (color negro). Nótese que para el caso de SL cuando la punta entra en contacto con la superficie, la amplitud prácticamente se reduce a cero, pero para el caso de CL queda aún una amplitud residual de ~5 nm.

---

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

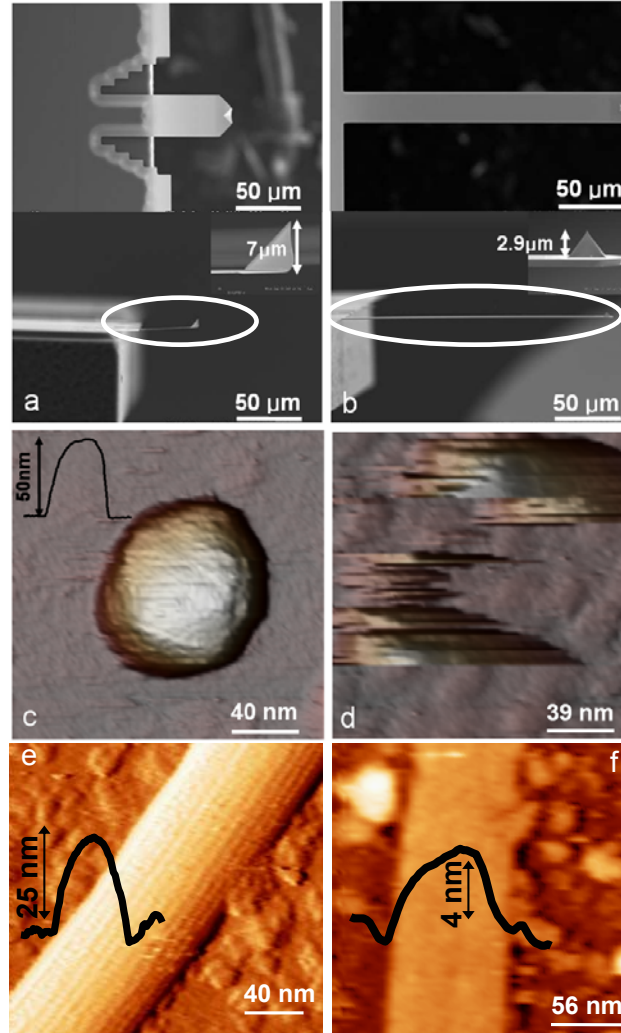
La preparación de las muestras utilizadas así como los protocolos de limpieza y preparación de las superficies empleadas para depositar las muestras tanto en este capítulo como en los siguientes están recogidas en el apéndice I

Bajo estas condiciones experimentales de trabajo obtuvimos imágenes de ambas muestras con las dos micropalanca en líquido utilizando AM-DAFM. La figura 2.9 resume los resultados de estas medidas.

En la primera columna se muestran los resultados cuando utilizamos la micropalanca SL: la imagen (a) se corresponde con una imagen de microscopía electrónica (EM) de SL donde se muestran las dimensiones de la micropalanca y de la punta, en la imagen (c) observamos la estructura del bacteriófago  $\Phi 29$  intacta presentando la altura nominal de 50 nm y en la imagen (e) distinguimos los protofilamentos a lo largo del microtúbulo alcanzado éste la altura nominal de 25 nm.

En la segunda columna se muestran los resultados cuando se utilizamos la micropalanca CL: la imagen (b) corresponde a una imagen de EM de la micropalanca y de la punta de CL, en la imagen (d) observamos el fago  $\Phi 29$  dañado irreversiblemente y la imagen (f) presenta el microtúbulo completamente abierto sobre la superficie mostrando una altura de 4 nm que se corresponde con la altura de los monómeros que forman la pared del microtúbulo. Obtuvimos resultados similares cuando usamos otra muestra biológica, un parvovirus.

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido



**Figura 2.9.** Resultados comparativos de la aplicación de AM-DAFM en medio líquido con las micropalancas SL y CL. (a) y (b), Imágenes de microscopía electrónica de las micropalancas SL y CL respectivamente. Nótese la gran diferencia entre las dimensiones de ambas micropalancas y de sus respectivas puntas. (c) Imagen del  $\Phi 29$  utilizando SL, donde el perfil muestra la altura nominal del virus (50 nm). (d) Misma imagen que (c) pero obtenida con CL, en la que el virus es dañado irreversiblemente. (e) Imagen de un microtúbulo utilizando SL, donde el perfil muestra la altura nominal del mismo (25 nm). (f) Misma imagen que (e) pero obtenida con CL, en la que el microtúbulo está completamente abierto sobre la superficie donde el perfil muestra una altura de 4 nm, correspondiente al espesor de la pared del microtúbulo.

La conclusión más inmediata de los resultados presentados es que la micropalanca CL aplica un fuerza mucho mayor que SL sobre las muestras en líquido. La pregunta que nos hacemos es ¿cuál es la diferencia entre ambas micropalancas para

que la fuerza ejercida sea tan diferente entre ellas? Como posibles factores que diferencien a una micropalanca de la otra podríamos señalar la constante elástica de muelle nominal, el factor de calidad, la frecuencia de resonancia, la masa efectiva y las dimensiones de las micropalancas (tabla 2.1).

Para poder responder a la pregunta, iniciamos una colaboración con el profesor A. Raman y su grupo de investigación de la Universidad de Purdue, Indiana (USA) con el objetivo de identificar, combinando teoría y experimentos, la dependencia de los picos de fuerza con algunos de los factores citados anteriormente. Para ello empleamos un método que realiza espectroscopia de aceleración sobre las muestras. Se trata de la microscopía de aceleración o *scanning probe acceleration microscopy* (SPAM) [Legleiter 2006]. Hemos aplicado el método SPAM a diferentes muestras con distintas propiedades mecánicas con el objetivo de conocer las fuerzas locales aplicadas sobre las mismas en líquidos. Hemos desarrollado también un modelo teórico con el objetivo de encontrar una expresión analítica que describa los picos de fuerza.

#### 2.4.2. Modelo teórico

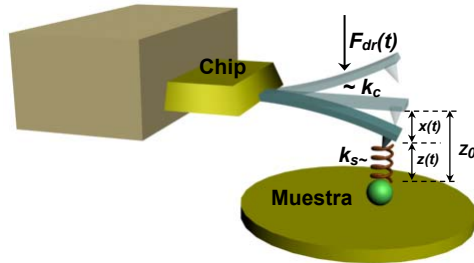
Para la búsqueda de una ley analítica de los picos de fuerzas, hacemos uso del modelo de “muelle de masa puntual” o “*point mass spring*” (apartado 1.4.2.2) de forma que el movimiento absoluto de la punta en AM-DAFM en medio líquido queda restringido a un grado de libertad y viene descrito por la siguiente ecuación:

$$\frac{\ddot{x}}{\omega_0^2} + \frac{\dot{x}}{\omega_0 Q} + x = \frac{F_0 \cos \omega t}{k_{ef}} + \frac{F_{ts}(z)}{k_{ef}} \quad (2.6)$$

donde  $k_{ef} = 1,0302k_c$  es la constante de muelle efectiva de la micropalanca para el movimiento de la misma en el primer modo normal de vibración [Melcher 2007] y  $k_c$  es la constante de muelle de la micropalanca calibrada por el método de Sader [Sader 1999],  $Q$  y  $\omega_0$  son el factor de calidad y la frecuencia de resonancia del primer armónico en líquidos respectivamente. En la figura 2.10 se muestra un dibujo esquemático del modelo propuesto para el movimiento de la punta donde observamos que la distancia instantánea entre punta y muestra viene dada por  $z(t) = Z_0 + x(t)$ .

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

---



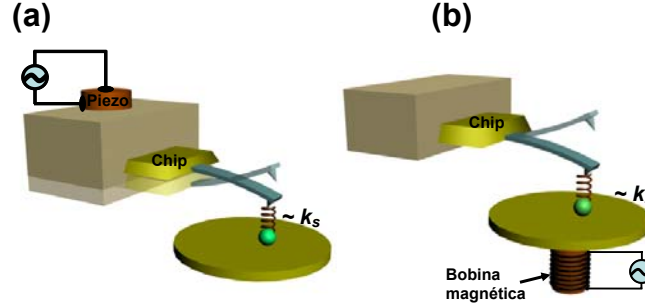
**Figura 2.10.** Dibujo esquemático del modelo empleado.

Para simplificar el análisis del modelo propuesto arriba realizamos las dos siguientes aproximaciones:

1) Consideramos a la micropalanca como un oscilador armónico forzado y amortiguado en cuya ecuación de movimiento sólo se tiene en cuenta el primer modo de vibración tanto lejos como cerca de la superficie. Para predecir de forma correcta el movimiento de la micropalanca cerca de la superficie en medio líquido, el segundo modo debería incluirse [Basak 2007 (a)]. Sin embargo, en el modelo desarrollado para obtener expresiones analíticas de las fuerzas asumimos que las contribuciones del segundo modo son insignificantes.

2) Asumimos que el movimiento medido de la punta mediante excitación acústica es el movimiento absoluto de la punta. Son varios los trabajos que han señalado diferencias importantes en el movimiento de la punta dependiendo de si la micropalanca es excitada magnética o acústicamente en líquidos [Herruzo 2007; Xu 2007]. En la figura 2.11 se representa el movimiento de la punta para ambos métodos de excitación donde vemos que para el caso de excitación acústica la cantidad de movimiento medido es la diferencia entre el movimiento absoluto de la punta y el movimiento del piezo, mientras que en la excitación magnética el movimiento medido se corresponde con el movimiento absoluto de la punta. El movimiento del piezo puede ser observado experimentalmente en la figura 2.8 (curva roja). Cuando la punta entra en contacto permanente con la muestra, la amplitud no se anula completamente, sino que sigue habiendo una pequeña amplitud residual debido a que el piezo continúa oscilando. Esta amplitud residual es muy pequeña comparada con el movimiento de la punta para pequeñas reducciones de la amplitud libre, de forma que podemos asumir que el movimiento medido es el movimiento absoluto de la punta.





**Figura 2.11.** Dibujo esquemático de los métodos de excitación: (a) acústica y (b) magnética. Obsérvese la diferencia del movimiento medido de la punta en relación con el movimiento absoluto de la misma entre ambos modos de excitación.

Para describir las fuerzas de interacción punta-muestra en AM-DAFM en líquidos, debemos tener en cuenta que la punta está realizando oscilaciones con una determinada amplitud y que al final de cada oscilación se produce contacto entre punta y muestra. Así que, habrá contribuciones de las fuerzas de vdW, de las fuerzas repulsivas EDDL y de las fuerzas repulsivas de contacto al final de cada oscilación. Dado que las muestras biológicas usadas en nuestros experimentos están inmersas en su medio fisiológico con altas concentraciones de sales, la distancia de Debye  $\lambda_D$ , es en estos casos, menor de 0.8 nm, por lo que las fuerzas EDDL pueden ser despreciadas. Las fuerzas de vdW son también pequeñas comparadas con las fuerzas repulsivas de contacto, por lo que consideraremos que en la fuerza de interacción punta-muestra sólo intervienen las fuerzas repulsivas de contacto, las cuales serán modeladas de forma diferente según la punta contacte con la superficie o con la muestra.

Cuando la punta contacte con una superficie dura de vidrio o mica, la fuerza de interacción punta-superficie es calculada según el modelo de contacto mecánico de Hertz entre una esfera y un plano [Hertz 1882]:

$$F_{ts}(z) = \begin{cases} 0, & \text{para } z > 0 \\ -\frac{4}{3} E^* R^{1/2} z^{3/2}, & \text{para } z \leq 0 \end{cases} \quad (2.7)$$

donde  $R$  es el radio de la punta,  $z$  es la distancia instantánea punta-superficie y  $E^*$  es el módulo de Young efectivo.

Cuando la punta contacte con las cápsidas víricas, según el modelo de la mecánica de cáscara elástica delgada, la respuesta elástica de éstas a pequeñas

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

indentaciones debe ser lineal [Landau 1986], por lo que la fuerza de interacción punta-muestra puede ser modelada como la de un muelle lineal:

$$F_{ts}(z) = \begin{cases} 0, & \text{para } z > 0 \\ -k_s z, & \text{para } z \leq 0 \end{cases} \quad (2.8)$$

donde  $k_s$  es la constante elástica de muelle de las muestras conocida a partir de las curvas experimentales de nanoindentación realizadas en medio líquido sobre las muestras (apartado 2.2).

Aplicando métodos de dinámica no lineal válidos para sistemas con bajo factor de calidad en las ecuaciones 2.6, 2.7 y 2.8, se pueden obtener las soluciones analíticas para los picos de fuerza [Xu aceptado]. Después de realizar estos cálculos, cuyos detalles no se van a especificar aquí, encontramos que la expresión analítica para el pico de fuerza de interacción repulsiva, según el modelo de contacto hertziano viene dada por:

$$F_{pico}^{rep} = 2^{1/8} 3^{-1/4} \pi^{3/4} (E^* \sqrt{R})^{1/4} \left( k_{ef} / Q \right)^{3/4} A_0^{9/8} (A_{ratio} - A_{ratio}^3)^{3/8} \quad (2.9)$$

De igual forma, la expresión para el pico de fuerza de interacción repulsiva, según el modelo de indentación lineal sobre las cápsidas víricas viene dada por:

$$F_{pico}^{rep} = 2^{-5/3} 3^{2/3} \pi^{2/3} k_s^{1/3} \left( k_{ef} / Q \right)^{2/3} A_0 (A_{ratio} - A_{ratio}^3)^{1/3} \quad (2.10)$$

donde  $A_0$  es la amplitud inicial y  $A_{ratio} = A / A_0$  es la razón entre la amplitud reducida usada como señal de realimentación y la amplitud inicial.

Las fórmulas analíticas 2.9 y 2.10 son sólo válidas bajo las siguientes condiciones de operación:

- La frecuencia de la señal de excitación deber ser igual a la frecuencia encontrada en el espectro del ruido térmico en líquido.
- Las indentaciones realizadas sobre las muestras deben ser pequeñas.
- Las reducciones de la amplitud libre deben ser pequeñas.

Como comentamos anteriormente, en el desarrollo de la ecuación de movimiento sólo hemos tenido en cuenta el primer armónico. La presencia de los armónicos mayores en los picos de fuerza se hace más notable a medida que  $A_{ratio}$  decrece. Así que, para cumplir los dos últimos requisitos expuestos arriba, debemos

trabajar con valores altos de  $A_{ratio}$ , lo que equivale a realizar pequeñas indentaciones y a usar como señal de realimentación pequeñas reducciones de la amplitud libre.

#### 2.4.3. Aplicación experimental del método SPAM

Para conocer experimentalmente los picos de fuerza ejercidos por la micropalanca sobre las muestras vamos a recurrir al método SPAM descrito en [Legleiter 2006]. El método SPAM se basa en el uso de AM-DAFM en líquidos, en el cual la micropalanca actúa como un acelerómetro.

De la ecuación 2.6 se puede despejar la aceleración de la punta, la cual también podemos conocer experimentalmente calculando la segunda derivada de la señal de deflexión:

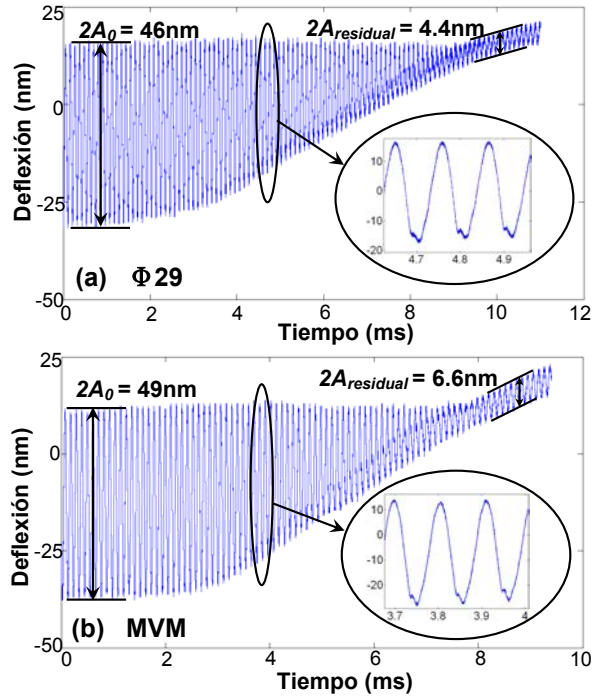
$$\ddot{x} = w_o^2 \left[ \frac{F_{ts}(z)}{k_{ef}} + \frac{F_{dr}(t)}{k_{ef}} - \frac{1}{w_o Q} \dot{x} - x \right] \quad (2.11)$$

De la ecuación 2.11 podemos conocer la contribución de los picos de fuerzas de interacción punta-muestra  $F_{ts}(z)$  a la aceleración, ya que el resto de términos pueden ser conocidos experimentalmente.

Hemos aplicado el método SPAM a dos tipos de cápsidas víricas diferentes: el bacteriófago  $\Phi 29$  y el virus diminuto del ratón (MVM), cuyas propiedades mecánicas son conocidas [Ivanovska 2004; Carrasco 2006]. En todos estos experimentos hemos utilizado la micropalanca SL, ya que así aseguraremos la conservación de la integridad estructural de las muestras. La forma de proceder a la hora de realizar la espectroscopia de aceleración sobre ambas muestras es similar. Se trata de realizar curvas de indentación sobre las muestras (apartado 2.2) a la vez que la micropalanca está oscilando. De la curva de aproximación, se registra la señal de deflexión frente al tiempo. La figura 2.12 muestra una de estas curvas de deflexión frente al tiempo realizadas sobre el fago  $\Phi 29$  y el virus MVM. Observamos que cuando la punta empieza a sufrir la fuerza de interacción con la muestra, la amplitud empieza a decrecer rápidamente de forma asimétrica mostrando una distorsión al final de cada oscilación (ver zoom en las gráficas de la figura 2.12). La distorsión está causada por el contacto intermitente de la punta con la muestra y se hace mayor a medida que la punta se va acercando, hasta que al final la punta entra en contacto total con la muestra. En este momento la amplitud debería reducirse a cero, sin embargo, como ya se comentó y

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

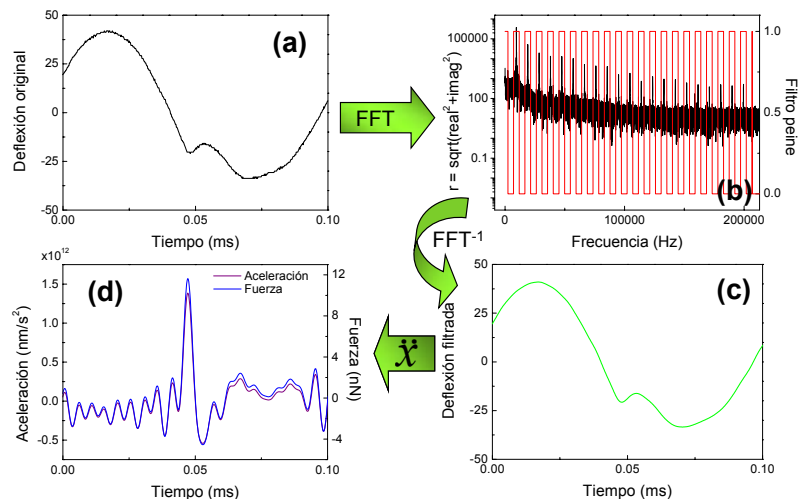
observamos en las gráficas de la figura 2.12, queda aún una amplitud residual  $A_{residual}$  debido a que el piezo continúa vibrando a pesar de que la punta está en contacto continuo con la muestra. La amplitud residual se corresponde con la amplitud de oscilación del piezo y podemos observar que es pequeña comparada con la amplitud libre  $A_0$ , sobre todo cuando se usan pequeñas reducciones de la amplitud libre como señal de realimentación, que son las condiciones en las que habitualmente trabajamos. Esta observación experimental justifica la segunda aproximación realizada en el desarrollo del modelo teórico.



**Figura 2.12.** Curvas experimentales de deflexión frente al tiempo. Las curvas son realizadas con la micropalanca SL sobre: (a) el fago  $\Phi 29$  y (b) el virus MVM. El zoom en ambas gráficas muestra la distorsión al final de cada oscilación. Nótese la pequeña amplitud residual remanente cuando la punta está en contacto total con la muestra. Las curvas fueron tomadas con una frecuencia de muestreo comprendida entre 5 y 20 MHz.

Ya que la fuerza de interacción está cambiando a lo largo de la curva de aproximación (Fig. 2.12), el método SPAM no puede ser aplicado a la curva entera y debe ser aplicado a cada ciclo de la deflexión. Dado que la velocidad de aproximación en nuestros experimentos es muy lenta ( $<0.5$  nm/ciclo de oscilación), podemos considerar a cada uno de los ciclos de deflexión como semi-estacionarios.

Para extraer los picos de fuerza a partir de curvas de deflexión experimentales semejantes a la representada en la figura 2.13.a, la señal de deflexión debe ser filtrada para eliminar el ruido que domina la segunda derivada de la señal de deflexión y que impedirá obtener de forma correcta los valores de los picos de fuerza. Dado que la mayor parte de la información de la trayectoria de la deflexión está contenida en los armónicos mayores, es posible filtrar la señal mediante la aplicación del denominado filtro peine o “*comb filter*” [Legleiter 2006].



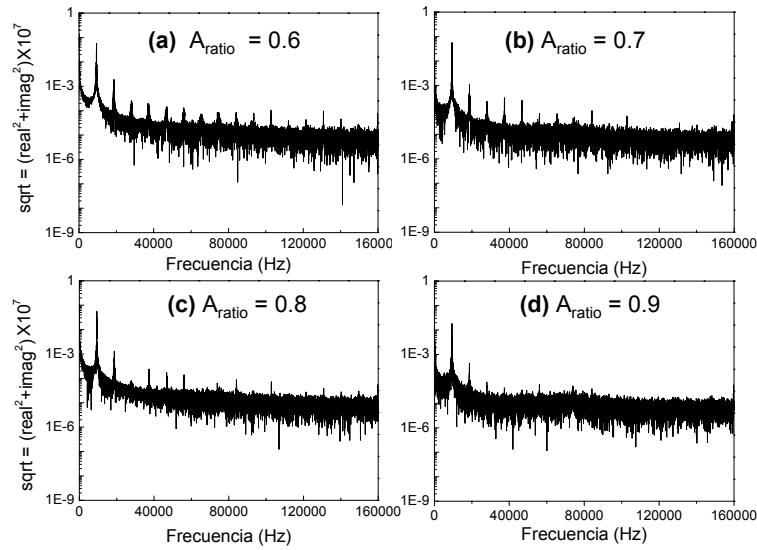
**Figura 2.13.** Aplicación del filtro peine y extracción del pico de fuerza. (a) Señal original de deflexión frente al tiempo. (b) Transformada de Fourier de la señal de deflexión (color negro), sólo se retienen las intensidades de las frecuencias de los armónicos (color rojo). (c) Transforma inversa de Fourier de (b), la cual proporciona la señal de deflexión reconstruida. (d) Calculando la segunda derivada de (c) se obtiene la aceleración (línea púrpura), la cual multiplicada por la masa efectiva de la micropalanca proporciona el pico de fuerza (línea azul).

Esta operación consiste en realizar la transformada de Fourier de la señal de deflexión original (Fig. 2.13.a), manteniéndose sólo las intensidades de las frecuencias de los armónicos en el espectro de Fourier (Fig. 2.13.b). Realizando la transformada inversa de Fourier se obtiene la señal de deflexión reconstruida después del filtrado (Fig. 2.13.c). Por último, calculando la segunda derivada de la señal de deflexión filtrada podremos conocer la aceleración (Fig. 2.13.d, línea púrpura). Si multiplicamos la aceleración obtenida de la señal de deflexión reconstruida por la masa efectiva de la micropalanca, obtendremos la fuerza total que la micropalanca ejerce sobre la muestra (Fig. 2.13.d, línea azul). La fuerza calculada en la Fig. 2.13.d corresponde con la fuerza

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

total. Para extraer los picos de fuerza correspondientes a la interacción punta-muestra  $F_{ts}(z)$  simplemente despejaremos el término  $F_{ts}(z)$  de la ecuación 2.11.

El éxito del uso del filtro peine para reconstruir la señal de deflexión depende del número de armónicos que aparezcan en la transformada de Fourier. El hecho de observar los armónicos mayores en la transformada de Fourier se debe a la distorsión que existe al final de cada ciclo de oscilación, ya que debido a esto una cierta cantidad de energía es desplazada hacia los armónicos mayores. Cuanto mayor sea la distorsión en la señal de deflexión mayor número de armónicos aparecerán en la transformada de Fourier, lo que facilitará la correcta reconstrucción de la señal y, consecuentemente, la obtención del pico de fuerza a partir de la segunda derivada de la señal de deflexión reconstruida. Esto puede ser comprobado experimentalmente. Basándonos en el hecho de que la distorsión en la señal de deflexión se hace más notable cuando  $A_{ratio} = A / A_0$  decrece [Legleiter 2005], hemos registrado señales de deflexión a diferentes valores de  $A_{ratio}$ . En la figura 2.14 se muestran las transformas de Fourier de estas señales de deflexión. A medida que  $A_{ratio}$  aumenta la distorsión en la señal de deflexión es menor, por lo que el número de armónicos en el espectro de Fourier va disminuyendo, lo que se traduce en una obtención de picos de fuerza menores [Legleiter 2006].

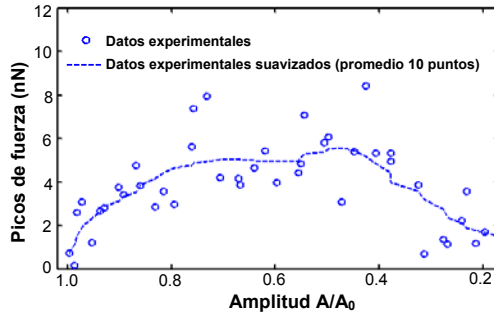


**Figura 2.14.** Espectros de Fourier de la señal de deflexión sobre una superficie de latex a diferentes valores de  $A_{ratio}$ . (a)  $A_{ratio} = 0.6$ , (b)  $A_{ratio} = 0.7$ , (c)  $A_{ratio} = 0.8$ , (d)  $A_{ratio} = 0.9$ . Obsérvese la disminución del número de armónicos en los espectros cuando  $A_{ratio}$  va aumentando.

La distorsión observada en las figuras 2.12 y 2.13 está relacionada con el reducido factor de calidad existente en líquidos debido al amortiguamiento. De hecho, en sistemas con factor de calidad grande (por ejemplo, cuando se trabaja en aire) este comportamiento es difícil de observar, por lo que utilizando el mismo valor de  $A_{ratio}$ , las fuerzas en *tapping* en aire son menores que en líquidos [Legleiter 2005].

#### 2.4.4. Combinación de teoría y experimentos

Repitiendo el proceso explicado en la figura 2.13 para cada ciclo de oscilación de cualquier curva de aproximación, nos permite representar los picos de fuerza de interacción máxima frente a los valores de la amplitud reducida de oscilación o *setpoints* utilizados expresados como  $A_{ratio}$  (Fig. 2.15).



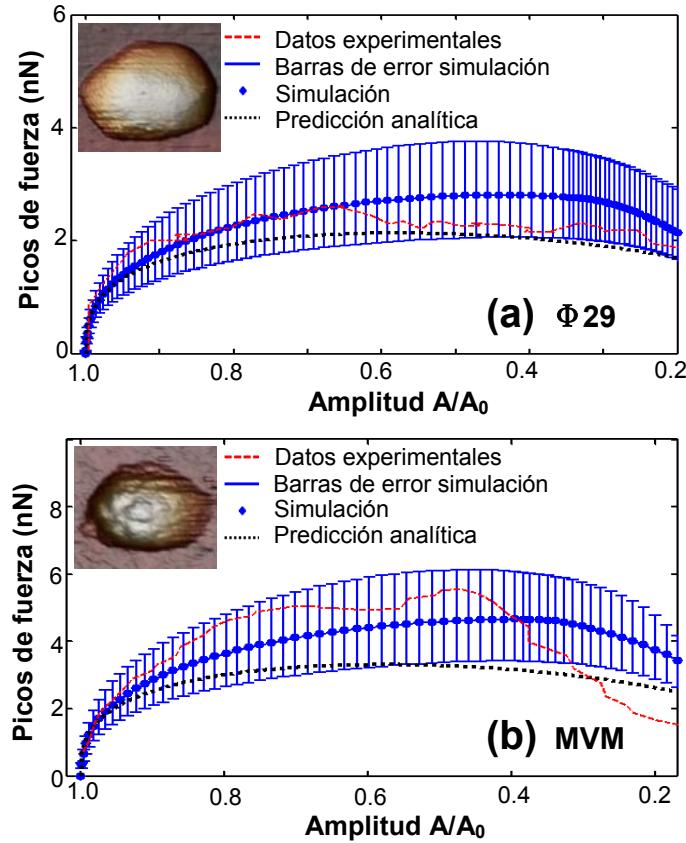
**Figura. 2.15.** Picos de fuerza (círculos) extraídos de las curvas de aproximación experimentales aplicando espectroscopia de aceleración sobre el virus MVM junto con la aplicación de un función de suavizado a los datos experimentales (línea discontinua), donde cada punto es el valor promedio de 10 puntos alrededor de él.

De esta forma, podemos realizar curvas de aproximación sobre el fago  $\Phi 29$  y el virus MVM en líquidos a diferentes amplitudes libres de oscilación. Cuando se utilizan amplitudes de oscilación demasiado pequeñas, la proporción de señal-ruido es baja, por esta razón las curvas de aproximación deben emplear los valores de las amplitudes libres necesarios para obtener una buena proporción de señal-ruido. La figura 2.16 muestra los picos de fuerza experimentales ejercidos sobre el  $\Phi 29$  y el virus MVM calculados con el método SPAM (línea roja) junto con los resultados de simulaciones numéricas (línea azul) realizadas por Xin Xu empleando las ecuaciones 2.6 y 2.8 y las predicciones analíticas mediante la ecuación 2.10 (línea negra), ambas usando los datos experimentales de la tabla 2.1.

Las amplitudes libres de oscilación pico a pico empleadas en la figura 2.16 son de 46 nm y de 49 nm para el  $\Phi 29$  y el MVM respectivamente. Las predicciones analíticas para los picos de fuerza discrepan un 20% de las simulaciones para valores de  $A_{ratio}$  mayores de 0.8 y un 30% para valores de  $A_{ratio}$  de 0.5. Cuando la amplitud llega a reducirse mucho y  $A_{ratio}$  decrece, los resultados derivados de las fórmulas analíticas

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

divergen de los predichos por las simulaciones, ya que en este caso las fórmulas analíticas dejan de ser válidas. Recordemos que una de las condiciones para poder aplicar tales fórmulas es que las indentaciones realizadas deben ser pequeñas.



**Figura. 2.16.** Picos de fuerza de interacción sobre el fago  $\Phi 29$  (a) y el virus MVM (b). Las curvas rojas representan los datos experimentales extraídos por el método SPAM (suavizado utilizando el promedio de 10 puntos), las curvas azules los resultados de las simulaciones junto con las barras de error (desviación estándar) y las curvas negras las predicciones analíticas.

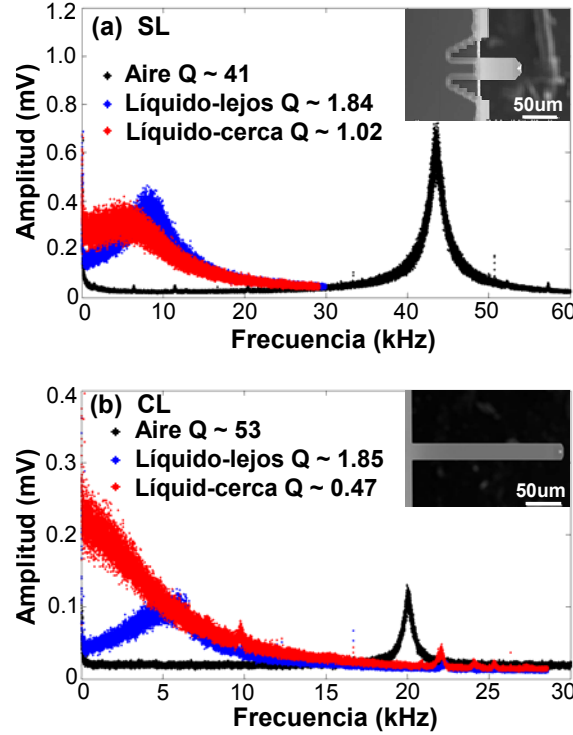
Los resultados de las simulaciones subestiman los valores de los picos de fuerza experimentales, pero si tenemos en cuenta un error del  $\pm 20\%$  en las medidas del factor de calidad ( $Q$ ), la constante de muelle de la micropalanca ( $k_c$ ) y de la constante elástica de muelle de la muestra ( $k_s$ ), estos errores se propagan en las simulaciones (barras de error en la figura 2.16), donde ahora observamos que los picos de fuerza experimentales están dentro del rango de los valores de los picos de fuerza encontrados



en la simulación. Obtuvimos resultados similares cuando analizamos otros conjuntos de curvas de aproximación sobre ambas muestras.

Las principales discrepancias entre los resultados del modelo teórico y los resultados experimentales pueden provenir principalmente por un lado, del hecho de que sólo el primer modo de vibración ha sido considerado en el modelo y por otro lado, de que en el modo de excitación acústica la micropalanca no es sólo oscilada por la fuerza inercial desde la base de la celda líquida, sino que también lo es por el movimiento del fluido que la rodea, generado por la vibración de la propia celda líquida. La fuerza de este movimiento puede ser mucho mayor que la fuerza de excitación inercial y no ha sido incluida debido a la dificultad de modelarla.

Es importante entender cómo la proximidad de la superficie afecta al movimiento de la micropalanca. La dependencia del amortiguamiento de la micropalanca cerca de la superficie es bien conocida [Green 2005; Basak 2006; Basak 2007 (b)]. La figura 2.17 muestra los espectros experimentales de vibración térmica para las dos micropalancas objeto de comparación, CL (a) y SL (b), en aire (línea negra), en líquido lejos de la superficie (línea azul) y en líquido cerca de la superficie (línea roja). Vemos que cuando CL y SL pasan del aire al medio líquido, los factores de calidad  $Q$  de ambas micropalancas disminuyen debido a los efectos hidrodinámicos. También observamos que ambos factores de calidad en líquido lejos de la superficie son similares pero cuando la punta se acerca más a la superficie encontramos un comportamiento inesperado: el factor de calidad para SL ( $Q \sim 1$ ) es aproximadamente 2 veces mayor que el encontrado para CL ( $Q \sim 0.5$ ). De hecho, el movimiento de la micropalanca CL cerca de la superficie se encuentra sobreamortiguado, implicando que no podemos encontrar un pico de resonancia en su espectro de vibración térmica. Este comportamiento tiene una gran influencia en los valores de los picos de fuerza ejercidos por CL.



**Figura 2.17.** Espectro térmico de las micropalancas: (a) SL y (b) CL, en aire (línea negra), en líquidos lejos de la superficie (línea azul) y en líquidos cerca de la superficie (línea roja). Se indica el factor de calidad  $Q$  en cada caso. Nótese el comportamiento sobrearmortiguado de CL en líquido cerca de la superficie.

Si aplicamos la ecuación 2.10 bajo las mismas condiciones experimentales, es decir, usando la misma amplitud libre  $A_0$  y la misma reducción de amplitud  $A_{ratio}$ , las fuerzas aplicadas serán proporcionales a  $\left(k_{ef}/Q\right)^{2/3}$ , por lo que teniendo en cuenta que la

constante de muelle nominal de CL es ~60% mayor que la de SL y que su factor de calidad cerca de la superficie es ~50% menor (ver tabla 2.1), encontramos que

$$\frac{F_{CL}}{F_{SL}} = \frac{(k_{ef}/Q)_{CL}^{2/3}}{(k_{ef}/Q)_{SL}^{2/3}} \approx 2 \text{ y } 4 \Rightarrow F_{CL} \approx 2 \text{ y } 4 F_{SL}.$$

La micropalanca CL aplica picos de fuerza que son entre 2 y 4 veces mayores a los ejercidos por la micropalanca SL. Para amplitudes del 80% de la amplitud libre, los picos de fuerza aplicados sobre las cápsidas víricas con SL están comprendidos entre 0.9 y 1.1 nN, mientras con CL estas fuerzas son entre 2.4 y 3.1 nN. La diferencia de fuerzas entre ambas micropalancas es

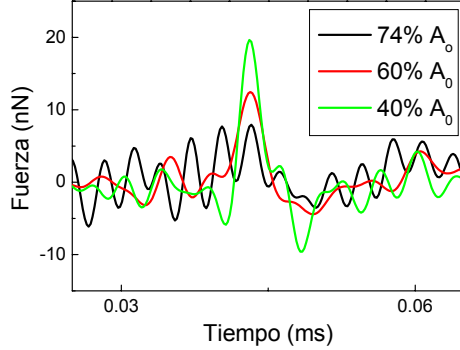
crítica, ya que la fuerza umbral para la rotura de estas cápsidas víricas está comprendida entre 2 y 3 nN [Ivanovska 2004]. La fuerza aplicada se minimizará eligiendo una micropalanca que cumpla un valor bajo de  $\left(\frac{k_{ef}}{Q}\right)$ .

Por otra parte, las condiciones de operación de AM-DAFM también pueden ser optimizadas ya que los picos de fuerza dependen de  $A_0(A_{ratio}-A_{ratio}^3)^{1/3}$ , por lo que para minimizarlos debe usarse una amplitud libre  $A_0$  pequeña y una reducción de amplitud también pequeña, es decir, un valor de  $A_{ratio}$  alto.

Experimentalmente hemos observado que SL puede oscilar de forma estable a amplitudes libres iniciales más bajas que la micropalanca CL, la cual típicamente usa amplitudes de oscilación mayores a los 20 nm. Esta diferencia se debe a las diferentes dimensiones entre ambas micropalancas, lo cual tiene dos importantes consecuencias en líquidos: por un lado, la masa efectiva de CL es aproximadamente 3 veces mayor que la de SL y por otro lado, el coeficiente de amortiguamiento en líquido (Ec. 2.2) para CL es 3 veces mayor que para SL. Estas dos consecuencias implican que, para que ambas micropalancas oscilen con la misma amplitud libre el piezo tendrá que oscilar mucho más con CL que con SL, resultando en una mayor amplitud residual para CL (ver figura 2.6). La existencia de una gran amplitud residual reduce el rango de amplitudes que pueden ser utilizadas como señal de realimentación, siendo en estos casos la razón señal/ruido mayor, por lo que el algoritmo que realiza la realimentación no funciona correctamente, dando lugar a inestabilidades en las medidas.

Hemos comprobado experimentalmente la dependencia de los picos de fuerza con el valor de la reducción de amplitud libre (Fig. 2. 18). Los picos de fuerza representados en la figura 2.18 fueron extraídos mediante el método SPAM de las curvas de aproximación realizadas sobre una superficie de vidrio. Observamos que cuando la amplitud libre se reduce a un 75%, la fuerza máxima aplicada es 7 nN; cuando se reduce a un 60%, el pico de fuerza es de 12 nN; y por último, la amplitud libre se reduce a un 40%, alcanzando el pico de fuerza un valor de 19 nN.

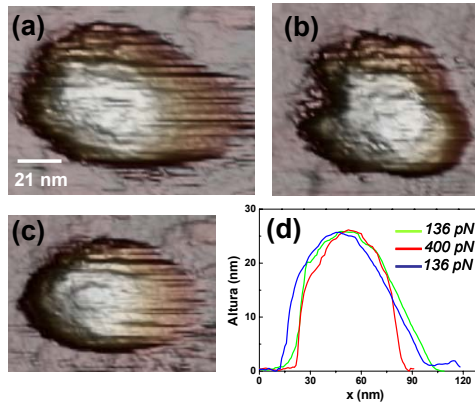
## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido



**Figura 2.18.** Dependencia de los picos de fuerza aplicados sobre una superficie de vidrio con una amplitud inicial de 68 nm, cuando se reduce a un 74% (línea negra), a un 60% (línea roja) y a un 40% (línea verde). Nótese el aumento del pico de fuerza a medida que la amplitud libre se reduce.

Para comprobar si las cápsidas víricas pueden soportar las fuerzas máximas calculadas con la fórmula analítica (Ec. 2.10) con las micropalanca SL y CL, vamos a aplicar estos valores de fuerzas usando ahora el modo JM en líquidos con la micropalanca CL sobre las cápsidas del virus MVM. Ya que la fuerza aplicada es proporcional a la amplitud libre, en ambos casos vamos a calcular la fuerza en las mejores condiciones experimentales posibles para cada micropalanca.

Para la aplicación con la micropalanca SL, utilizamos los siguientes parámetros:  $A_0 = 5$  nm,  $A_{ratio} = 8$ ,  $k_s = 0.6$  N/m,  $k_{ef} = 0.063$  N/m,  $Q = 1$  y encontramos que la fuerza máxima es  $F_{pico}^{rep} \approx \left( \frac{k_{ef}}{Q} \right)^{\frac{2}{3}} A_0 (A_{ratio} - A_{ratio}^3)^{\frac{1}{3}} \approx 400$  pN. Usamos JM para obtener una imagen de la cápsida del MVM aplicando una fuerza de 136 pN (Fig. 2.19.a).

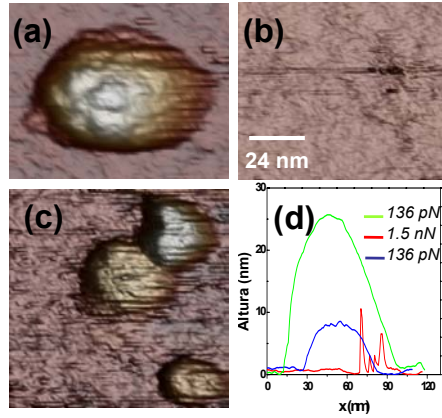


**Figura 2.19.** Aplicando la fuerza correspondiente a la micropalanca SL. Imágenes sucesivas de la cápsida del MVM obtenidas con JM aplicando fuerzas de: (a) 136 pN, (b) 400 pN y (c) 136 pN. (d) Muestra los perfiles de altura de la cápsida del MVM en las tres imágenes anteriores.

Observamos que la cápsida presenta la altura correcta y sin ninguna rotura o daño. En la siguiente imagen de la misma cápsida, aplicamos una fuerza de 400 pN (Fig. 2.19.b). Por último, volvemos a obtener otra imagen de la misma zona aplicando la fuerza inicial de 136 pN (Fig. 2.19.c). Si comparamos los perfiles topográficos sobre

las cápsidas de las tres imágenes, observamos que los tres perfiles presentan la altura nominal del virus correspondiente a 25 nm y que la estructura de la cápsida no ha sufrido ningún daño irreversible (Fig. 2.19.d).

Para la aplicación con la micropalanca CL utilizamos los siguientes parámetros:  $A_0 = 10$  nm,  $A_{ratio} = 8$ ,  $k_s = 0.6$  N/m,  $k_{ef} = 0.072$  N/m,  $Q = 0.5$  y encontramos que el valor de la fuerza máxima es  $F_{pico}^{rep} \approx \left( \frac{k_{ef}}{Q} \right)^{2/3} A_0 (A_{ratio} - A_{ratio}^3)^{1/3} \approx 1.5$  nN. Usamos de nuevo JM para obtener una imagen de una cápsida del MVM aplicando una fuerza 136 pN (Fig. 2.20.a). En la imagen posterior de la misma cápsida, aplicamos una fuerza de 1.5 nN (Fig. 2.20.b) y observamos que la cápsida ha colapsado e incluso ha sido arrastrada sobre la superficie. Por último, volvemos a obtener otra imagen de la misma zona aplicando la fuerza inicial de 136 pN (Fig. 2.20.c) y comprobamos que la cápsida ha quedado reducida a tres trozos. Si comparamos los perfiles topográficos sobre las cápsidas de las tres imágenes, observamos que al aplicar 1.5 nN provocamos una rotura irreversible en la estructura de la cápsida (Fig. 2.20.d).



**Figura. 2.20.** Aplicando la fuerza correspondiente a la micropalanca CL. Imágenes sucesivas de la cápsida del MVM obtenidas con JM aplicando fuerzas de: (a) 136 pN, (b) 1.5 nN y (c) 136 pN. (d) Muestra los perfiles de altura de la cápsida del MVM en las tres imágenes anteriores.

En este punto, basándonos en los resultados experimentales y teóricos, podemos responder a la cuestión inicial que nos planteamos sobre la diferencia de comportamiento entre las micropalancas estudiadas. Podemos concluir que las principales razones por las que la micropalanca SL aplica menos fuerza en comparación con CL son las siguientes: su valor nominal de constante de muelle, ya que es ~40% menor y su factor de calidad  $Q$  cerca de la superficie, que es 2 veces mayor que el encontrado para CL, donde el comportamiento de ésta última llega a estar

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

sobreamortiguado. El hecho de que la longitud de la punta de SL sea mucho mayor que la de CL (ver figuras 2.9.a y 2.9.b) nos asegura que cuando la punta toca la muestra al final de cada ciclo, la distancia desde la micropalanca a la superficie será mayor, minimizándose así el amortiguamiento hidrodinámico entre la micropalanca y la superficie.

### **2.5. RESUMEN**

En este capítulo se ha profundizado en el conocimiento del funcionamiento del AFM en medio líquido. Propiedades importantes de la micropalanca, como su frecuencia de resonancia y factor de calidad, sufren drásticos cambios en medio líquido debido al amortiguamiento hidrodinámico. Dicho efecto provoca que el movimiento de la micropalanca en líquidos difiera sustancialmente respecto al movimiento en aire, lo cual a su vez influye en los modos de medida. Concretamente cuando se utiliza JM la fuerza de adhesión es casi inexistente, lo que implica que la fuerza aplicada sea baja y que se puedan usar micropalancas con bajas constantes de muelle. Por estos motivos, el empleo de JM en líquidos es sencillo y muy recomendable cuando se trabaja con muestras biológicas. Por el contrario, cuando se utiliza AM-DAFM con excitación acústica aparecen dos problemas: por un lado, la aparición de múltiples picos de resonancia en el espectro de frecuencias, lo que dificulta la correcta elección del pico de resonancia de la micropalanca y por otro lado, debido a que sólo existe régimen de contacto intermitente, la punta siempre va a estar tocando la muestra al final de cada ciclo de oscilación (*tapping*), lo que implica la aplicación de fuerzas no controladas sobre las muestras.

Estos dos problemas han sido estudiados con el objetivo de profundizar en el conocimiento del complejo funcionamiento de AM-DAFM en líquidos.

Hemos utilizado un simple método mecánico para eliminar el bosque de picos en AM-DAFM acústico en líquidos. El método consiste en introducir en el montaje experimental un material amortiguador muy cerca del piezoeléctrico para que absorba las vibraciones residuales provenientes de las resonancias del piezo.

Para conocer las fuerzas aplicadas en AM-DAFM en líquidos hemos combinado experimentos y teoría. Para ello, hemos desarrollado fórmulas analíticas con el objetivo de caracterizar las fuerzas de interacción aplicadas por una micropalanca oscilando

## 2. El microscopio de fuerzas atómicas en medio líquido

mediante excitación acústica sobre muestras blandas en líquidos. Las fórmulas analíticas describen la dependencia cuantitativa de las fuerzas con parámetros característicos de las micropalanca, propiedades de las muestras y condiciones de operación. Esta dependencia teórica ha sido confirmada experimentalmente, mediante la obtención de los picos de fuerza ejercidos por una micropalanca sobre dos cápsidas víricas mecánicamente diferentes. Para medir los picos de fuerza utilizamos un método, basado en la aplicación de la espectroscopia de aceleración, en el que la micropalanca actúa como un acelerómetro. Las fórmulas analíticas desarrolladas pueden ser utilizadas para estudiar qué tipo de micropalanca debemos escoger en cada caso, es decir, qué propiedades debe tener y bajo qué condiciones de operación hay que trabajar para que la fuerza aplicada sobre una determinada muestra sea la deseada por el usuario y así poder obtener imágenes de muestras biológicas en medio fisiológico de forma exitosa.

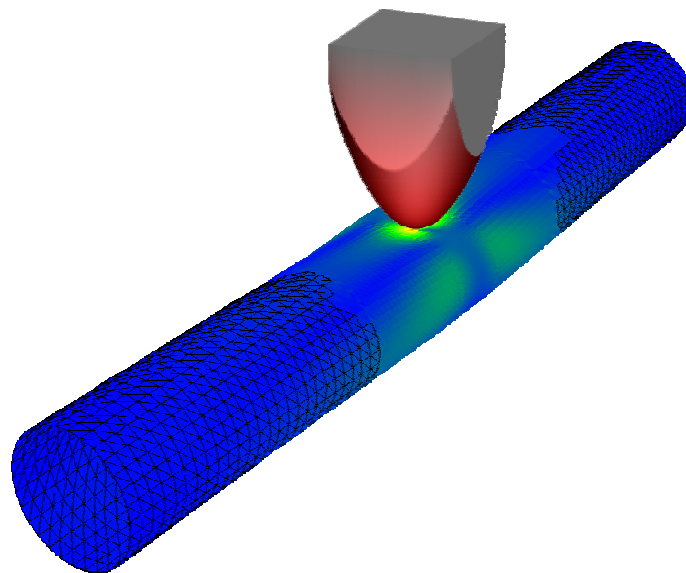
El AFM, además de obtener imágenes de alta resolución de biomoléculas puede ser utilizado como una técnica de espectroscopia de fuerzas mediante la realización de nanoindentaciones. A partir de las curvas de indentación podemos conocer las propiedades mecánicas de las muestras. Por lo que, el AFM se nos presenta como una poderosa herramienta para la biología estructural ya que permite determinar la topografía superficial y la función de biomoléculas en su medio nativo con resolución subnanométrica.





## CAPÍTULO 3:

### MICROTÚBULOS Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS



*"La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda", Voltaire.*



### **3. MICROTÚBULOS Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS**

Uno de los temas más fascinantes de la biofísica molecular es el complicado y multifuncional comportamiento del citoesqueleto de las células eucarióticas involucrado en la orientación espacial y coordinación de la mayoría de los procesos celulares. Se trata de una estructura altamente dinámica que actúa a la vez como músculo y como esqueleto para permitir el movimiento y proporcionar estabilidad a la célula. Dadas las diversas y complejas funciones que realiza, los filamentos que lo componen deben poseer unas características estructurales y mecánicas muy interesantes.

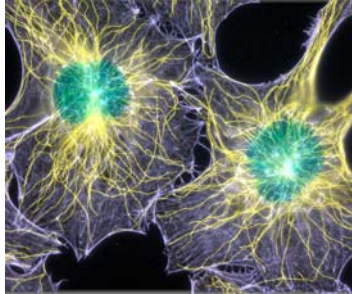
Hemos utilizado el AFM en líquidos para estudiar la caracterización estructural, las propiedades mecánicas y la interacción con ciertas proteínas de uno de los tres tipos de filamentos que componen el citoesqueleto: los microtúbulos. Todo el trabajo experimental descrito en el presente y en el siguiente capítulo fue desarrollado en colaboración con Iwan A. T. Schaap durante dos estancias de investigación realizadas a lo largo del desarrollo de esta tesis en el grupo de Physics of Complex Systems de la Vrije Universiteit de Amsterdam dirigido por el Profesor Christoph F. Schmidt.

#### **3.1. EL CITOESQUELETO: MICROTÚBULOS**

El citoesqueleto es una estructura supramolecular o red tridimensional dinámica formada por filamentos que se encuentra en el citoplasma de las células eucarióticas. Esta estructura (Fig. 3.1) define la forma y arquitectura celular, participa activamente en los procesos de meiosis y mitosis [Alberts 2002], permite el movimiento y transporte intracelular a través de las proteínas motoras y participa en los procesos de interacciones intercelulares.

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

---



**Figura 3.1.** Imagen de microscopía óptica de fluorescencia de células eucarióticas. Podemos observar dos de los filamentos que forman el citoesqueleto en el interior de las mismas: los microtúbulos (amarillos) y los filamentos de actina (grises) incrementando el grosor de la membrana celular. El núcleo celular se observa en color verde. Imagen realizada por Wittmann, T., The Scripps Research Institute, La Jolla.

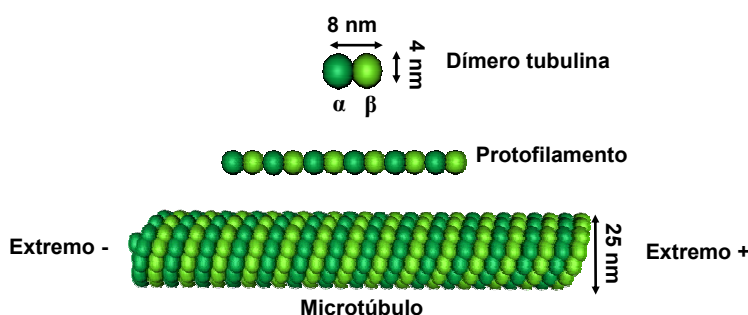
El citoesqueleto está constituido por tres tipos de filamentos:

1) Filamentos de actina: están formados a partir de una proteína globular contráctil denominada G-actina, la cual se polimeriza en dos cadenas de subunidades globulares enrolladas helicoidalmente entre sí para formar el filamento de F-actina con un diámetro aproximado entre 5 y 6 nm y una longitud de varias micras. Son estructuras altamente dinámicas, cuya polimerización está regulada por proteínas conocidas como “proteínas de unión a actina”. Estos filamentos son importantes en los procesos de desplazamiento y adhesión celular, intervienen en los procesos de fagocitosis, refuerzan la membrana plasmática formando justo por debajo de la misma una densa red de filamentos conocida como cortex celular (Fig. 3.1), su asociación con la proteína motora miosina los convierte en los responsables de la contracción de las células musculares y también tienen un importante papel en la división celular ya que forman el anillo de contráctil que permite el estrangulamiento celular durante la citocinesis.

2) Filamentos intermedios: son estructuras de aproximadamente 10 nm de diámetro formadas por un conjunto de proteínas específicas para cada tipo celular: queratina, en las células epiteliales; filamentos de la lámina nuclear, que refuerzan la membrana nuclear; neurofilamentos, ubicados en células nerviosas; etc. Su principal función es proporcionar rigidez estructural a la célula debido a su gran resistencia mecánica, lo que es crucial para proteger a las células contra presiones y tensiones. Son estructuras relativamente estáticas.

3) Microtúbulos: están compuestos de dímeros formados por subunidades globulares de las proteínas  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, de diámetro 4 nm y peso molecular 55 kDa cada una. Estos dos monómeros se unen para formar un dímero, los cuales se autoensamblan entre sí formando una fila de dímeros que se denomina protofilamento

(pf). Los protofilamentos (pfs) se conectan lateralmente unos con otros para dar origen al microtúbulo (MT) que es una estructura cilíndrica hueca con un diámetro exterior de 25 nm, un diámetro interior de 15 nm [Amos 1995] y una longitud que puede variar desde decenas de nanómetros hasta cientos de micras (Fig.3.2). Las condiciones necesarias para llevar a cabo el proceso de formación o polimerización de los microtúbulos (MTs) son: temperatura de  $\sim 37^\circ\text{C}$ , concentración de tubulina en el citoplasma,  $\text{Mg}^{++}$  y energía bioquímica en forma del nucleótido guanosín trifosfato (GTP). En el MT siempre hay un extremo terminado con  $\alpha$ -tubulina (extremo -) y otro extremo terminado con  $\beta$ -tubulina (extremo +).

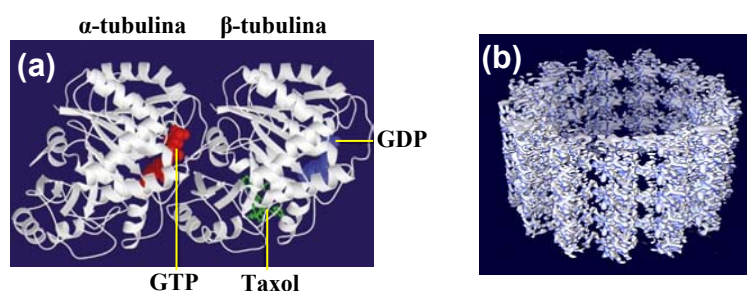


**Figura 3.2.** Dibujo esquemático donde se muestran las dimensiones del dímero de tubulina (compuesto por  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina), la formación de un protofilamento mediante la unión de dímeros y el microtúbulo polimerizado a través de la conexión lateral de los protofilamentos. En un microtúbulo compuesto de 13 pfs cada uno de ellos se encuentra desplazado 0.92 nm con respecto al siguiente.

La estructura atómica de la tubulina ha sido resuelta por cristalografía electrónica [Nogales 1998], así como la estructura del MT completo ha sido reconstruida en 3D mediante criomicroscopía electrónica [Nogales 1999] (Fig. 3.3). Durante la polimerización, las subunidades  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina se encuentran unidas a una molécula de GTP. El nucleótido GTP desempeña una función puramente estructural en la  $\alpha$ -tubulina pero es hidrolizado en la  $\beta$ -tubulina a guanosín difosfato (GDP) cuando se une un nuevo dímero, liberando energía (Fig. 3.3.a). Esto confiere al dímero un carácter asimétrico y al MT una polarización. De forma que en el extremo positivo, terminado en  $\beta$ -tubulina con GTP, los ritmos de polimerización y despolimerización serán muy altos en comparación con el extremo negativo [Tran 1997]. La polaridad existente en el MT hace que estas estructuras sean altamente dinámicas, siendo estabilizadas *in vivo* por un grupo de proteínas denominadas proteínas asociadas a los microtúbulos o MAPs. Dentro de la célula se está

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

produciendo constantemente una regeneración de la red de MTs de forma que éstos están continuamente alargándose y acortándose según lo requiera la célula. A este comportamiento se le llama inestabilidad dinámica [Mitchison 1984; Horio 1986].



**Figura 3.3.** (a) Estructura atómica del dímero de tubulina con una resolución de 3.7 Å [Nogales 1998], donde se muestran la  $\alpha$ -tubulina, la  $\beta$ -tubulina y las zonas de unión de las moléculas de GTP (molécula roja) y GDP (molécula color azul) respectivamente, así como la molécula de *taxol* (molécula verde) unida a la  $\beta$ -tubulina. (b) Reconstrucción de la estructura de un microtúbulo con una resolución de 8 Å [Nogales 1999].

Para estabilizar los MTs y prevenir su despolimerización *in vitro* es habitual el uso de una droga denominada *paclitaxel* que es extraída del árbol *Taxus brevifol*. El *paclitaxel* o *taxol* se une a la  $\beta$ -tubulina en una región específica [Snyder 2001] y diferente de la zona de unión de la molécula de GTP (Fig. 3.3.a). El *paclitaxel* actúa como agente estabilizador minimizando la disociación de la  $\beta$ -tubulina-GDP en los extremos + de los MTs e induciendo el ensamblaje de la  $\beta$ -tubulina-GDP normalmente inactiva. El *paclitaxel* es utilizado en medicina para estabilizar los MTs de células cancerígenas. De esta forma se inhibe su dinamismo y funcionalidad evitando que los MTs puedan realizar la división celular.

Los MTs polimerizados *in vivo* están compuestos normalmente de 13 protofilamentos [Tilney 1973]. Cada pf se une al adyacente desplazándose con respecto al siguiente 0.92 nm, generando una hélice levógira (Fig. 3.2). Los MTs polimerizados *in vivo* son originados en el centro organizador de microtúbulos que, en las células animales, se llama centrosoma de forma que los MTs crecen desde el centrosoma hacia la periferia adoptando una organización radial (Fig. 3.1). En MTs polimerizados *in vitro*, el número de pfs puede variar entre 11 y 17, dependiendo de las condiciones fisiológicas [Pierson 1978].

Los MTs son filamentos más rígidos que los filamentos de actina y que los filamentos intermedios por lo que sirven, entre otras muchas cosas, para dar forma a la

célula. Forman parte del huso mitótico de las células eucarióticas, se localizan en forma de haces en los axones neuronales, están presentes en el aparato locomotor de cilios y flagelos y también actúan como carriles sobre los cuales las proteínas motoras, como la kinesina y dineína [Hirokawa 1998], transportan vesículas y grandes moléculas de un sitio a otro de la célula.

#### 3.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS MICROTÚBULOS CON AFM EN MEDIO LÍQUIDO

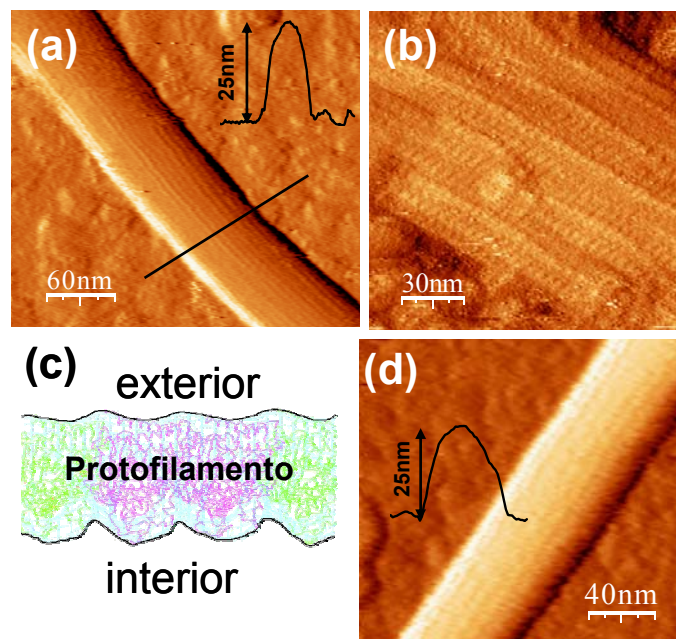
Para estudiar y entender los procesos dinámicos descritos anteriormente así como la interacción de los MTs con las proteínas motoras y MAPs es necesario resolver su estructura molecular en condiciones fisiológicas. Como comentamos en el capítulo 1, el microscopio electrónico puede proporcionar resolución molecular pero requiere fijar y teñir o congelar las muestras, por lo que impide observar cualquier proceso dinámico en su medio fisiológico. Por otra parte, el microscopio óptico no tiene suficiente resolución para distinguir estructuras del tamaño de las subunidades de tubulina (4 nm). Así que, el AFM se presenta como una técnica que cumple los requisitos exigidos: proporcionar alta resolución molecular junto con la posibilidad de trabajar en condiciones fisiológicas a temperatura ambiente.

El hecho de que los MTs sean estructuras huecas constituidas de proteínas los convierte en estructuras muy frágiles, por lo que el uso de los modos dinámicos AM-DAFM en líquidos ha sido siempre problemático. Las fuerzas aplicadas por la micropalanca han limitado la resolución induciendo daños irreversibles en la estructura [Fritz 1995; de Pablo 2003], lo que incitó al uso de sustancias químicas, como el glutaraldehído, que actúan como conexión de unión entre las proteínas o “*cross-linking*” reforzando la estructura del complejo proteico [Vinckier 1996]. Pero el empleo de sustancias de “*cross-linking*” afecta a las propiedades dinámicas y mecánicas de los MTs, por lo que su utilización con material biológico es bastante cuestionable. En cambio, el modo JM en líquidos se revela como un modo de medida adecuado proporcionando imágenes de alta resolución de los MTs en líquido sin provocar daños y sin la necesidad de usar ningún “*cross-linker*”, siendo posible aplicar fuerzas menores de 300 pN [de Pablo 2003; Schaap 2004]. Fuerzas superiores a los 300 pN provocan un daño irreversible en la estructura del MT [de Pablo 2003].

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

La velocidad de barrido del modo AM-DAFM es superior a la alcanzada por JM, lo cual puede ser una ventaja cuando se quieran estudiar procesos biológicos dinámicos. Por esta razón, procedimos a trabajar con AM-DAFM en líquidos utilizando la micropalanca comercial BioLever [BL-RC150VB]. La fuerza aplicada en AM-DAFM líquidos sobre una muestra depende de las propiedades mecánicas de la micropalanca, de las condiciones de operación y de las propiedades de la muestra (apartado 2.3). En el capítulo 2 demostramos que el empleo de la micropalanca BioLever (denominada SL) en AM-DAFM líquidos con muestras biológicas blandas puede proporcionar imágenes de alta resolución sin inducir daños en las muestras, ya que la fuerza aplicada es mucho menor que la ejercida por otras micropalancas más convencionales.

En la figura 3.4 comparamos la resolución obtenida en las imágenes de MTs utilizando AM-DAFM y JM con las micropalancas SL y CL respectivamente en líquidos.



**Figura 3.4.** Imágenes de AFM de MTs en líquidos utilizando distintos modos de operación. (a) MT completo usando AM-DAFM. Podemos observar los pfs paralelos al eje axial del MT. (b) MT abierto sobre la superficie empleando AM-DAFM. Los monómeros son resueltos en la cara interna del MT. (c) Dibujo esquemático mostrando que la rugosidad de los monómeros es mayor en la cara interna que en la cara externa del pf. (d) MT completo utilizando JM. Tanto la aplicación de AM-DAFM como de JM muestran al MT con una altura correspondiente con su valor nominal (25 nm).



La aplicación de AM-DAFM en líquidos muestra la estructura intacta de un MT en la que podemos resolver varios pfs dispuestos paralelamente al eje axial del MT (Fig. 3.4.a). En la figura 3.4.b observamos la estructura de un MT completamente abierto sobre la superficie, en la que los monómeros de tubulina son claramente resueltos en la cara interna del MT utilizando AM-DAFM. Esto también ha sido observado mediante JM en líquidos [Schaap 2004]. El hecho de resolver los monómeros de tubulina sólo en la cara interna de la pared del MT y no en la cara externa es consistente con los datos proporcionados por criomicroscopía electrónica [Nogales 1999], los cuales indican que la rugosidad de los monómeros es mucho más marcada en la cara interior que en la exterior del pf (Fig. 3.4.c). La figura 3.4.d muestra la imagen de un MT obtenida con JM en líquidos, donde de nuevo el perfil de altura coincide con el valor nominal y la resolución alcanzada es comparable a la obtenida con AM-DAFM [Schaap 2004].

La amplitud libre usada en las imágenes con AM-DAFM es 10 nm y la amplitud reducida utilizada como señal de realimentación es ~80% de la amplitud libre. Como veremos en el apartado siguiente la constante elástica de muelle de los MTs ha sido estimada en  $k_s = 0.07$  N/m [Schaap 2006]. Con todos estos valores podemos estimar que la fuerza máxima aplicada en estas imágenes es del orden de 280 pN (Ec. 2.9), la cual está por debajo de la fuerza crítica de rotura estimada para los MTs [de Pablo 2003; Schaap 2006].

#### 3.3. PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS MICROTÚBULOS

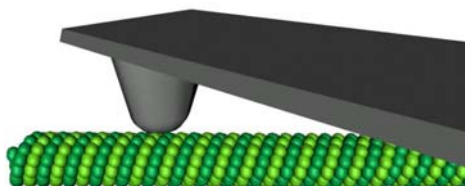
Para entender la relación entre la estructura molecular y las funciones del citoesqueleto hay que empezar por estudiar el comportamiento de los filamentos que lo componen por separado. Dadas las complejas y diversas funciones que los MTs realizan en el interior de la célula es de esperar que éstos presenten unas propiedades mecánicas interesantes. La resistencia que presentan los MTs a doblarse es una propiedad muy importante de estos filamentos para muchas de sus funciones biológicas. La rigidez flexural (ver apéndice II) de los MTs ha sido medida mediante el análisis de su forma en las fluctuaciones térmicas [Gittes 1993] y mediante el uso de pinzas ópticas [Felgner 1996]. Para complementar los datos experimentales conocidos sobre la resistencia de los MTs a doblarse o curvarse (conocidos como experimentos de

*bending*), nosotros vamos a estudiar cómo los MTs se comportan bajo la acción de diferentes fuerzas de compresión. Estas fuerzas van a ser aplicadas localmente en la dirección radial del MT, de esta forma podremos saber cómo los MTs responden a una indentación radial (apartado 2.4). Estos experimentos también pueden proporcionarnos información sobre la fuerza de los enlaces interdímeros.

A continuación, presentamos los resultados experimentales sobre el estudio de la respuesta elástica lineal y respuesta elástica no lineal de un MT sometido a una indentación radial. Para simular y comprender el comportamiento mecánico del MT observado experimentalmente, vamos a realizar varios modelos de la estructura del MT así como de la geometría y tamaño de la punta del AFM aplicando métodos de elementos finitos.

#### 3.3.1. Resultados experimentales

Las curvas de fuerza-indentación son realizadas sobre los MTs de la forma indicada en la figura 3.5. La deformación de un objeto depende de la fuerza aplicada, de la forma del objeto y de su módulo de Young.



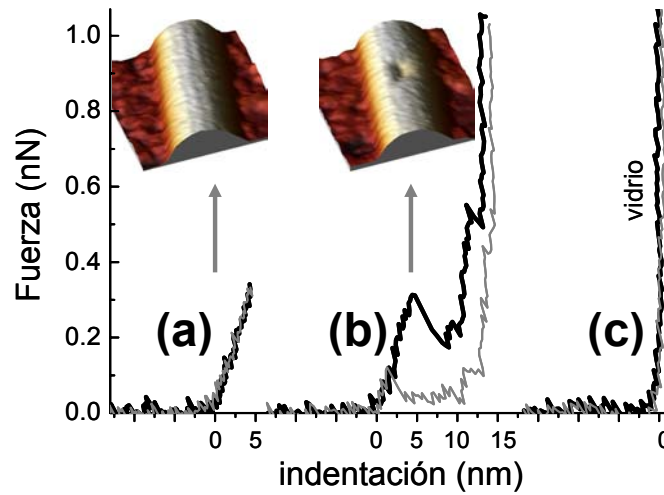
**Figura 3.5.** Dibujo esquemático del experimento de indentación radial. La punta de la micropalanca es posicionada sobre el MT deformándolo localmente.

Para comprobar la independencia de los resultados experimentales con el tipo de micropalanca empleada, utilizamos dos tipos de micropalancas diferentes: RC800PSA y BL-RC150VB, cuyos parámetros nominales se encuentran recogidos en el tabla 2.1. La gran mayoría de las micropalancas fueron calibradas usando el método de Sader [Sader 1999].

##### 3.3.1.1. Respuesta elástica lineal

La respuesta elástica medida en un MT depende de su forma tubular y de las propiedades elásticas de las proteínas de tubulina que componen su pared. Para una geometría cilíndrica hueca macroscópica construida de un material homogéneo e isótropo sometida a una carga o fuerza puntual se espera una respuesta elástica lineal para deformaciones del orden del espesor de la pared del tubo [Landau 1986], el cual se podrá doblar, pandear e incluso colapsar, fenómenos que un sólido rígido no puede

hacer. La figura 3.6 muestra que los MTs responden como tubos macroscópicos para fuerzas aplicadas del orden de 0.3 nN, lo que corresponde a una deformación del mismo de aproximadamente 3.6 nm. Observamos que en este rango la respuesta elástica es lineal y reversible sin inducir daños en la estructura del MT (Fig. 3.6.a) y que sólo con fuerzas aplicadas superiores a 0.3 nN aparecen saltos discontinuos, donde la deformación es no lineal e irreversible provocando daños en la estructura del MT (Fig. 3.6.b). La rotura del MT es principalmente causada por la ruptura de los enlaces de proteínas entre las subunidades de tubulina.

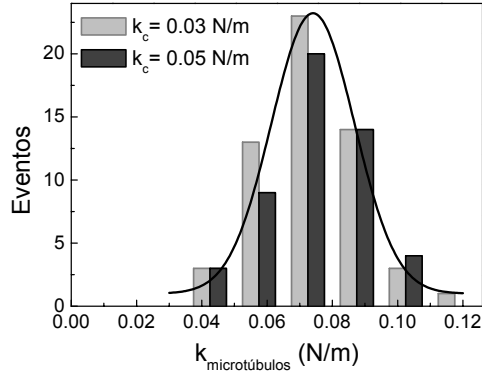


**Figura 3.6.** Curvas experimentales de fuerza frente a indentación sobre MTs. La línea negra y la gris representan las curvas de ida y de vuelta respectivamente. (a) Respuesta elástica de un MT que se deforma lineal y reversiblemente hasta fuerzas de  $\sim 0.3$  nN. La imagen de AFM del MT después de la indentación no presenta ningún daño. (b) Aplicamos una fuerza  $> 0.3$  nN y observamos una deformación irreversible en la curva de vuelta (línea gris). La imagen de AFM del MT después de la indentación muestra un daño en la pared del MT. (c) Curva de indentación sobre la superficie de vidrio.

Para determinar la reproducibilidad de la parte elástica lineal de la deformación (Fig. 3.6.a) representamos más de 100 curvas de indentación en 14 experimentos diferentes con los dos tipos de micropalanca. Aunque las micropalancas tienen parámetros diferentes, los resultados encontrados en la respuesta a la deformación son independientes del tipo de micropalanca utilizada (Fig. 3.7). Para cuantificar la constante elástica de muelle  $k$  del MT realizamos ajustes a la parte lineal de la deformación (apartado 2.4). En la figura 3.7 se muestran los histogramas de los valores de la constante elástica de todas las curvas de indentación analizadas para los dos tipos

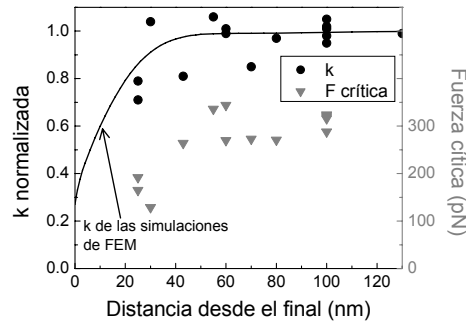
### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

de micropalanca. Un ajuste gaussiano de los datos nos indica que el valor de la constante elástica de muelle para los microtúbulos es  $0.074 \pm 0.013$  N/m.



**Figura 3.7.** Histogramas de la constante elástica de muelle  $k$  medida sobre los MTs utilizando dos micropalanca diferentes: en gris claro con la de  $k_c = 0.03$  N/m (número de eventos = 57) y en gris oscuro con la de  $k_c = 0.05$  N/m (número de eventos = 50). El ajuste gaussiano de los dos histogramas (línea negra) resulta en un valor promedio de  $k = 0.074 \pm 0.013$  N/m.

Cuando se aplica una carga o fuerza puntual sobre una geometría tubular de pared fina, la región de deformación bajo esta fuerza se extiende varias decenas de nanómetros hacia ambos lados en la dirección axial [de Pablo 2003]. Esto implica que el extremo del MT debe ser mecánicamente más blando. Para comprobar este efecto experimentalmente, modificamos varios MTs aplicándoles fuerzas superiores a 0.3 nN cerca de los extremos (ver dibujo en la figura 3.8). La constante de muelle y la fuerza a la cual los MTs colapsan (fuerza crítica) son calculadas en función de la distancia desde el extremo del MT (Fig. 3.8).

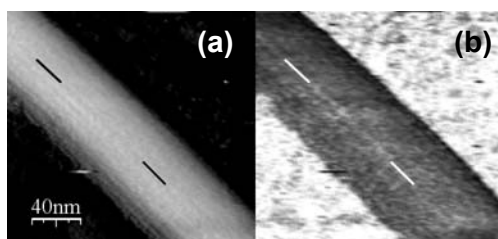


**Figura 3.8.** Experimentos de indentación realizados cerca del extremo del MT (ver dibujo). Se muestran los valores de  $k$  (normalizados a los valores obtenidos en el MT lejos del extremo) y la fuerza crítica en función de la distancia desde el extremo del MT. La curva representa el resultado de las simulaciones predichas por FEM.

Experimentalmente, resultó difícil realizar curvas de indentación a distancias menores de 20 nm desde el final del MT. En la gráfica de la figura 3.8 también representamos una curva con los resultados obtenidos de las simulaciones realizadas con métodos de elementos finitos (FEM) [FEMLAB 3.1i] utilizando el modelo de cáscara elástica delgada o “*thin-shell*” [Schaap 2006]. Las predicciones de la simulación reproducen los resultados experimentales, donde observamos que a distancias mayores

o aproximadamente iguales a 50 nm desde el extremo del MT no se observa ningún efecto. En cambio, a distancias menores de 50 nm desde el extremo del MT éste es mecánicamente más blando, por lo que estos efectos sólo ocurren a distancias menores de 50 nm desde el extremo final del MT.

Para estudiar más variaciones locales en la dureza superficial del MT obtuvimos mapas de elasticidad (apartado 2.4). La figura 3.9 muestra la topografía de un MT (Fig. 3.9.a) junto a su correspondiente mapa de elasticidad (Fig. 3.9.b). Observamos por un lado, que la superficie del MT es mucho más blanda que la superficie del vidrio sobre la que el MT se encuentra apoyado y por otro lado, que existe una distribución casi homogénea de la dureza sobre la superficie del MT: la dureza es constante en el centro y a lo largo de unos pocos nm a cada lado del MT, pero decrece ligeramente hacia los lados del mismo.



**Figura 3.9.** (a) Mapa topográfico y (b) de elasticidad de un MT, adquiridos simultáneamente. Los tonos más oscuros representan las zonas más blandas. El MT es ligeramente más duro en las zonas de conexión entre pfs (marcado con líneas en ambas imágenes) que en la parte superior de éstos.

Las imágenes también muestran un patrón axial representando a los pfs (marcado con líneas en la figura 3.9). Si comparamos el mapa topográfico con el mapa de elasticidad, observamos que la zona de conexión entre los pfs del MT es ligeramente más dura que la parte superior de ellos. De hecho el análisis del mapa de elasticidad revela que la diferencia en la dureza entre la zona de unión y la parte superior de un pf es aproximadamente del 10%. Esta diferencia no queda reflejada en los histogramas de la figura 3.7 ya que está dentro del ruido de las medidas.

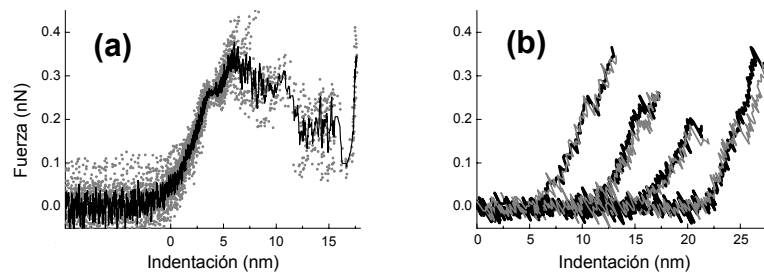
#### 3.3.1.2. Respuesta elástica no lineal

Como hemos comentado anteriormente, la respuesta de un tubo con pared delgada es lineal para indentaciones que escalan con el espesor de la pared. Para indentaciones mayores ocurre un fenómeno de inestabilidad elástica denominado pandeo o *buckling*, en el que se produce una inversión de curvatura desde convexo a cóncavo en la dirección radial [Landau 1986]. En nuestros experimentos, la situación puede ser modificada de varias formas: las fluctuaciones térmicas de la micropalanca

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

(~0.5 nm) causan una transición suave al contacto; la inserción de la punta en una pared de espesor finito [Johnson 2001] provoca un reforzamiento gradual en una escala de ~1 nm, la indentación total en esta escala está dominada por la compresión de la pared; el tamaño de punta finito causa un incremento del área de contacto y puede llegar a ser notable a grandes indentaciones, cancelándose los efectos del *buckling*.

En el apartado anterior mostramos que el colapso de los MTs sucede cuando la fuerza aplicada es mayor a 0.3 nN, donde la deformación es no lineal e irreversible. Para estudiar los eventos que ocurren cerca del colapso, realizamos curvas de indentación con suficiente resolución temporal limitando la fuerza aplicada a valores comprendidos entre 0.3 y 0.4 nN. Sorprendentemente, esto revela una inestabilidad que consiste en un salto bien definido de ~1 nm a una fuerza de  $0.27 \pm 0.08$  nN, produciéndose el colapso catastrófico de los MTs para fuerzas superiores (Fig. 3.10.a).

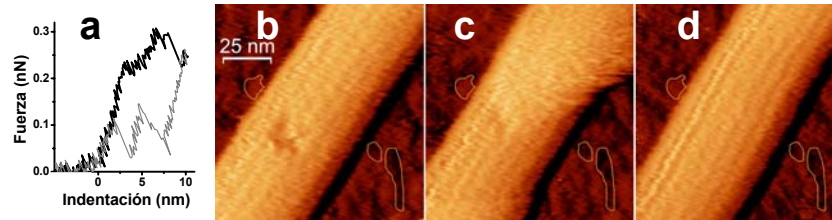


**Figura 3.10.** Curvas experimentales de indentación realizadas sobre MTs. (a) 24 curvas pertenecientes a 5 MTs diferentes son superpuestas mostrando un salto de ~1 nm a una fuerza promedio de 0.27 nN. Después del salto la deformación continúa con la misma pendiente inicial hasta que la fuerza alcanza el valor de ~0.35 nN produciéndose el colapso del MT. (b) Curvas individuales realizadas en distintas sesiones experimentales sobre MTs. Las curvas de vuelta (gris) son casi idénticas a las de ida (negro) excepto que el salto a la vuelta ocurre a una fuerza promedio ligeramente menor de 0.21 nN.

En la figura 3.10.b aplicamos suficiente fuerza para observar este salto pero sin provocar el colapso del MT. Estas curvas de indentación muestran que el salto es reversible pero con una cierta histéresis. Así, en la curva de vuelta observamos saltos a fuerzas ligeramente menores de  $0.21 \pm 0.04$  nN. Las imágenes no revelan ningún daño en la estructura de los MTs. En la gran mayoría de los casos pudimos realizar múltiples curvas de este tipo sobre una misma zona del MT sin observar daños en las imágenes posteriores, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de auto-reparación.

En algunas ocasiones, encontramos que este mecanismo de auto-reparación no estuvo limitado a la pequeña inestabilidad inicial. En la figura 3.11.a se muestra una

curva donde la punta se indentó 10 nm en la pared del MT observándose un colapso sustancial en la curva de vuelta. La imagen del MT después de esta indentación (Fig. 3.11.b) muestra la modificación producida en la estructura del MT como un orificio en la parte superior con dos pfs claramente dañados. Las imágenes siguientes a ésta realizadas sobre la misma zona muestran que el orificio se repara lentamente (Figs. 3.11.c y 3.11.d). No había tubulina libre en la disolución por lo que el mecanismo de auto-reparación depende probablemente de la reconexión de los enlaces de proteínas rotos.



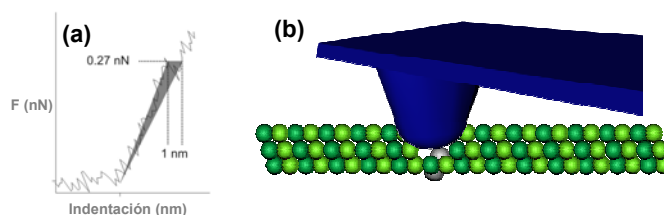
**Figura 3.11.** Mecanismo de auto-reparación de un MT. (a) Curva de indentación, en la que la punta se indenta 10 nm. La curva de vuelta (gris) muestra un colapso sustancial del MT. (b) Imagen del MT después de la indentación de 10 nm, donde observamos el daño producido sobre dos pfs vecinos. (c, d) Secuencia de imágenes siguientes de la misma zona del MT (veáanse las marcas sobre la superficie) mostrando que el MT se auto-repara después de unos 4 minutos debido a la reconexión de los enlaces de tubulina.

El pequeño salto reversible de  $\sim 1$  nm es causado probablemente por la ruptura de enlaces laterales y longitudinales entre los dímeros de tubulina. Podemos estimar la energía necesaria para producir un defecto en la pared del MT utilizando el área bajo la curva de indentación (Fig. 3.12.a). La inestabilidad ocurre aproximadamente sobre 1 nm a una fuerza promedio de 0.27 nN, por lo que la energía para producir este cambio es  $1.35 \times 10^{-19}$  J ( $32.8 k_B T$ ).

Mediante modelización se ha estimado que los enlaces laterales entre dímeros (entre 3.2 y  $5.7 k_B T$ ) son  $\sim 5.2$  veces más débiles que los enlaces axiales (entre 18.5 y  $27.8 k_B T$ ) [Vanburen 2002]. Esto es consistente con las reconstrucciones de los MTs por microscopía electrónica que muestran que las conexiones laterales entre pfs son mucho más delgadas que las axiales [Li 2002] y con los estudios realizados sobre el proceso de despolimerización que muestran que los enlaces laterales se disocian antes que los axiales [Tran 1997]. Realizando una indentación adecuada sobre la pared del MT es posible la ruptura de dos enlaces laterales y uno axial, quedando un dímerno de tubulina unido por un extremo en la red de la pared del MT (Fig. 3.12.b) para posteriormente

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

auto-repararse. Si utilizamos la proporción entre la energía de los enlaces laterales y axiales (enlace lateral  $5\times <$  enlace axial) en el caso expuesto de la figura 3.12, las energías de los enlaces son  $23.7 k_B T$  para el enlace axial y  $4.5 k_B T$  para los enlaces laterales entre dímeros. Estos valores, derivados experimentalmente asumiendo una mínima ruptura de los enlaces, son consistentes con los calculados teóricamente para las energías de enlace [Vanburen 2002].



**Figura 3.12.** (a) Curva experimental de fuerza-indentación mostrando la inestabilidad o salto de  $\sim 1$  nm a una fuerza promedio de 0.27 nN. La parte sombreada es el trabajo necesario para provocar la inestabilidad. (b) Ruptura de dos enlaces laterales y uno axial, dando lugar al desplazamiento de un dímero de tubulina bajo la acción de la punta.

#### 3.3.2. Modelando la respuesta elástica del microtúbulo

Para relacionar cuantitativamente las medidas experimentales de las curvas de indentación con la geometría y dimensiones del MT, así como la posible influencia del tamaño de la punta, realizamos una combinación de métodos analíticos y de elementos finitos computacionales [Schaap 2006]. Modelamos a los MTs como tubos huecos o “shells” elásticos homogéneos con dimensiones basadas en la proyección axial del mapa de densidad electrónica de los MTs proporcionado por K. Downing (ver dibujo en la figura 3.16). Mediante el uso de métodos de elementos finitos hemos utilizado también este modelo para estudiar la influencia de heterogeneidades longitudinales en la estructura del MT, como son los protofilamentos.

La respuesta elástica de un MT a la indentación realizada con la punta del AFM no sólo depende de las propiedades elásticas locales y de la geometría del MT sino también de las condiciones de contorno. De hecho, la relación entre la fuerza y la indentación depende sensiblemente de la proximidad de la punta al extremo del MT, como comprobamos anteriormente. Por simplicidad, vamos a usar un MT largo sobre el cual los efectos de los extremos no son importantes.

Para las mismas condiciones de contorno, forma de la punta y geometría de un tubo cilíndrico elástico homogéneo de espesor  $t$  y radio  $R$ , la relación lineal entre fuerza



e indentación deber ser proporcional al módulo de Young  $E$  del material. Así, al aplicar una fuerza puntual sobre esta geometría, la constante elástica  $k$  va a ser de la forma  $k = E \times R \times F(t/R)$ , donde  $F$  es una función adimensional de  $t/R$ .

1) Modelo de pared delgada.

En el límite de cáscara delgada o “*thin shell*” ( $R \gg t$ ), la compresión de la pared del tubo en su dirección normal, es decir, la variación del espesor de la pared, puede ser despreciada por lo que la deformación del tubo está dominada por la curvatura, la compresión y elasticidad transversal o de corte en el plano paralelo al tubo (apéndice II). En este límite se conoce que [de Pablo 2003]:

$$k = f / \Delta z \cong CEt^{5/2} / R^{3/2} \quad (3.1)$$

donde el prefactor  $C$  depende de las condiciones particulares de contorno y débilmente de  $t/R$ . Para fuerzas puntuales iguales y opuestas el prefactor puede ser calculado analíticamente [de Pablo 2003] basándose en los métodos de la teoría de elasticidad de cáscara delgada o “*thin-shell*”, cuyos resultados son consistentes con las predicciones de FEM (Fig. 3.13). Hay dos conclusiones principales del análisis teórico:

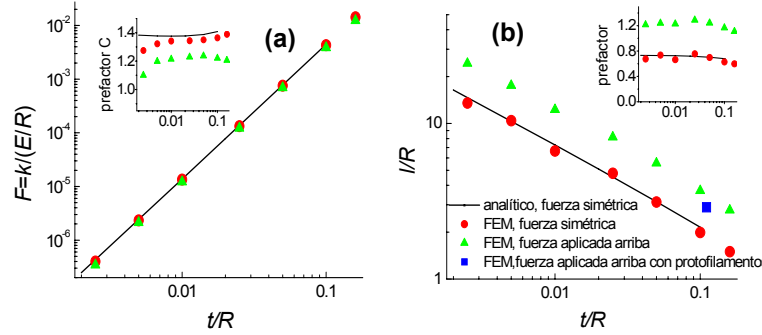
- La constante elástica  $k$  varía con el espesor  $t$  y el radio del tubo  $R$  según la aproximación de la ecuación 3.1. Como se muestra en la figura 3.13.a,  $F = k / (E \times R)$  varía como  $(t/R)^{5/2}$  con un prefactor  $C$  que es constante dentro de un error del 2% para  $t/R < 0.1$ .

- La longitud axial característica de deformación es:

$$l \approx R(R/t)^{1/2} \quad (3.2)$$

calculada desde el punto de aplicación de la fuerza. La figura 3.13.b compara la longitud de deformación  $l$  obtenida analíticamente con los resultados de FEM.

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

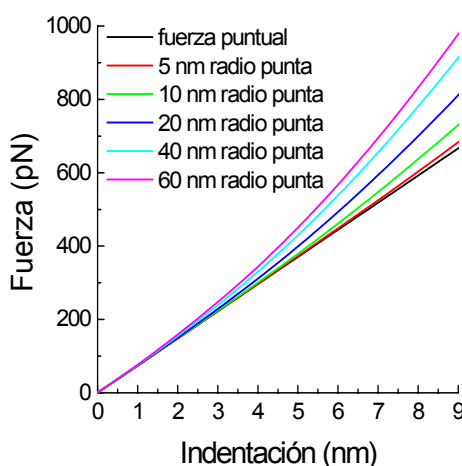


**Figura 3.13.** Comparación entre el comportamiento del modelo analítico y los cálculos de FEM. (a) Dependencia de  $k$  con  $t/R$ . (b) Dependencia de la longitud axial de deformación con  $t/R$ . La curva negra en ambos casos representa el resultado analítico con un prefactor  $C = 1.38$  y  $C = 0.7$  para (a) y (b) respectivamente (ver las gráficas pequeñas). Los resultados de FEM se muestran en rojo para un tubo cargado simétricamente, en verde para un tubo cargado radialmente desde la dirección superior y apoyado sobre una superficie plana a lo largo de toda su longitud. El comportamiento de todos los modelos es idéntico, excepto que los prefactores dependen de las condiciones de contorno. El punto azul corresponde con la longitud deformada del MT con pfs mostrando que la presencia de pfs no causa ningún cambio sustancial en  $l/R$ .

En el caso de los cálculos analíticos, la longitud de deformación decae exponencialmente en la dirección axial. Para los resultados de FEM, la longitud es determinada por un ajuste exponencial del perfil de deformación usando la forma  $e^{-x/l}$  donde  $x$  es la distancia axial desde el punto de indentación. Encontramos que  $l \cong 0.7R(R/t)^{1/2}$  con un error del 10% en el rango  $0.005 < t/R < 0.1$ . Aunque estos resultados han sido calculados para fuerzas puntuales opuestas, los análisis de FEM predicen que las ecuaciones 3.1 y 3.2 son válidas para diferentes condiciones de contorno.

Debido que la longitud axial deformada es superior que los radios de las puntas del AFM ( $\sim 20$  nm) y que para pequeñas indentaciones la forma del tubo permanece convexa, es decir, no se produce el fenómeno de *buckling*, se puede asumir una fuerza puntual para pequeñas indentaciones. Para estudiar el efecto de una distribución de carga más realista, modelamos la indentación del tubo con una punta parabólica de diferentes radios. En este caso, los resultados de FEM para el modelo de “*thin-shell*” dan una respuesta no lineal ya que el área de contacto aumenta con la indentación. En la figura 3.14 se muestran las curvas de indentación calculadas para los diferentes radios de punta donde observamos la no linealidad, es decir,  $k$  aumenta con la indentación y este efecto es mayor para puntas con radios más grandes. Para

deformaciones de  $\sim 4$  nm, este efecto es menor del 10%. En cualquier caso, se espera que este efecto ocurra después del fenómeno de *buckling*, el cual no se tiene en cuenta en este modelo por lo que el resultado es sólo válido cualitativamente, desplazándose las curvas de indentación hacia la parte superior de la gráfica para indentaciones superiores a 4 nm a medida que el tamaño de la punta aumenta.

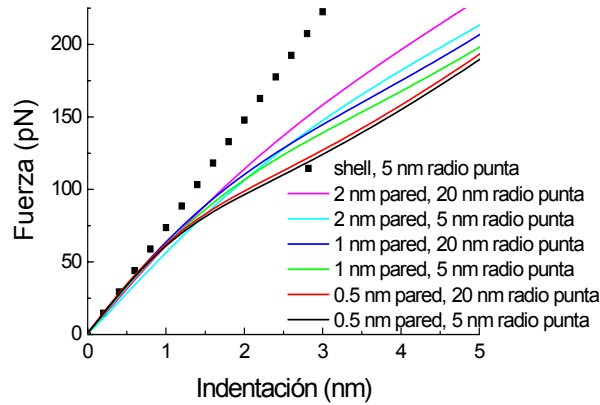


**Figura 3.14.** Efectos del tamaño finito de la punta en la respuesta elástica del tubo. Los tubos de radio 10 nm, espesor de pared 1.6 nm y módulo de Young 0.6 GPa están apoyados sobre superficies y son sometidos a indentaciones radiales desde la parte superior. Observamos que a indentaciones de  $\sim 4$  nm con una punta realista de radio 40 nm, los efectos son pequeños y sólo se diferencian en un 10%. Para indentaciones superiores a 4 nm, los efectos del tamaño de punta empiezan a ser notables.

## 2) Modelo de pared gruesa.

Los MTs tienen un espesor de pared que no es despreciable comparado con su radio ( $t/R \sim 0.2$ ). Por eso, el modelo de FEM de pared gruesa o “*thick-wall*” puede ser una buena aproximación. Este modelo tiene en cuenta la compresión del espesor de la pared en la dirección normal y los efectos de *buckling*. Esperamos dos efectos en la respuesta de este modelo: por un lado, la respuesta mecánica debería ser más blanda que la predicha por el modelo de “*thin-shell*” debido a la compresión de la pared del tubo y por otro lado, el fenómeno de *buckling* hará más suave el comportamiento a indentaciones mayores. Debido a la compresibilidad natural de la pared del tubo, las indentaciones con una fuerza muy localizada resultan en inestabilidades numéricas. Por eso, en las simulaciones sólo vamos a utilizar puntas parabólicas con un radio superior a 5 nm. La figura 3.15 muestra las curvas de indentación para diferentes espesores de pared y radios de la punta, donde el módulo de Young es calculado utilizando la ecuación 3.1 en cada caso.

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas



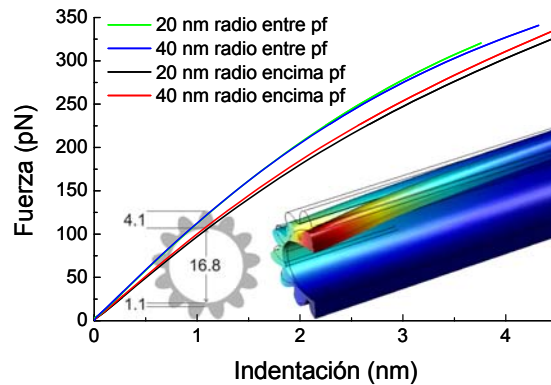
**Figura 3.15.** Efectos del tamaño finito de la punta y del espesor de la pared en la respuesta del tubo. Los tubos, de radio 10 nm apoyados sobre superficies son indentados radialmente desde la parte superior. El fenómeno de *buckling* ocurre para pequeñas deformaciones, esto más obvio para espesores de pared más finos. La indentación crítica para la aparición del *buckling* escala con el espesor de la pared, lo cual es parcialmente ocultado para indentaciones con radios de puntas y espesores de pared mayores.

Observamos que para pequeñas indentaciones la respuesta a la indentación es más blanda que la calculada en el modelo de “*thin-shell*” para el mismo espesor de pared y módulo de Young. La discrepancia entre ambos modelos es mayor para los casos con paredes más gruesas y puntas más finas. Como era de esperar, el efecto de *buckling* ocurre cuando la indentación es igual al espesor de la pared, produciéndose un cambio en la pendiente de la curva de indentación, que es relativamente compensado por el tamaño finito de la punta, el cual causa que la carga sea distribuida lateralmente sobre el MT. El efecto de *buckling* es menos pronunciado para espesores de pared mayores, donde el tamaño de la punta tiene más de un efecto ya que la longitud deformada decrece (Ec. 3.2) y el área de contacto entre la punta y el tubo será mayor. Como se muestra en la figura 3.14, el tamaño finito de la punta causa un desplazamiento de las curvas hacia arriba, lo cual está parcialmente compensado por el efecto de *buckling*.

#### 3) Protofilamentos.

Al modelar los MTs como tubos homogéneos ignoramos la presencia de los protofilamentos, los cuales forman parte de su estructura. Sin embargo, el modelo inicial de un MT como un tubo homogéneo sin estructura no está tan lejos de la realidad como puede parecer ya que la mayor parte de la tensión (*strain*) está localizada en las zonas de unión entre los protofilamentos y el modelo homogéneo usa un espesor

de pared efectivo cerca al de las uniones entre pfs. Para aproximarnos más a la realidad, hemos construido un modelo que consiste en un tubo encima del cual los pfs se encuentran posicionados como carriles o nervios externos axiales, con dimensiones basadas en la proyección axial del mapa de densidad electrónica de los MTs proporcionado por K. Downing. En la figura 3.16 se muestra el dibujo de este modelo así como las curvas de indentación realizadas en las zonas de conexión entre pfs y en la parte superior de los pfs. Observamos que estas curvas son muy similares a las del modelo de pared gruesa, donde de nuevo, el radio de la punta no presenta ningún efecto reseñable en la deformación para pequeñas indentaciones. Si comparamos los resultados cuando la indentación es realizada en las zonas de unión entre pfs y encima de ellos, observamos que los pfs individuales se deforman más fácilmente que las zonas de unión entre ellos. La diferencia de dureza encontrada entre las zonas de unión de los pfs y la parte superior de éstos es aproximadamente del 13%, lo cual es también visible en el mapa de elasticidad del MT (Fig. 3.9).



**Figura 3.16.** Modelo de un MT que incluye un tubo base y los protofilamentos. El módulo de Young es 0.6 GPa. La respuesta elástica del MT cuando la fuerza se aplica en las zonas de unión entre pfs (línea verde y azul) muestra una mayor dureza que cuando la fuerza se aplica encima de los pfs (línea negra y roja) para diferentes radios de punta. El dibujo de la derecha muestra la deformación predicha por FEM, donde la escala de colores indica la distribución de tensiones sobre el MT (los colores más oscuros se corresponden con las zonas con menos tensión). El dibujo de la izquierda muestra las dimensiones utilizadas en el modelo.

El hecho de que la dureza medida en la zona de unión entre pfs sea mayor, a pesar de ser la zona más delgada de la pared del MT, se debe a que cuando la indentación se realiza en la zona de unión entre pfs con una punta de radio finito (normalmente entre 20 y 40 nm), la carga se distribuye sobre dos pfs y la dureza

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

---

aparente del MT es ligeramente mayor que cuando la indentación se realiza exactamente encima de un pf individual. Si comparamos este modelo heterogéneo con los modelos de un tubo homogéneo observamos que, en el primer caso la punta consigue una menor indentación en la pared del tubo lo que resulta en una mayor independencia con el radio de la punta. Para deformaciones mayores, la punta contactaría también con otros pfs vecinos, resultando en un incremento de la dureza en la respuesta elástica. Experimentalmente, este punto nunca se alcanza ya que los MTs colapsan antes de que esto ocurra. El mejor ajuste entre este modelo y los datos de indentación se encuentra con un módulo de Young de 0.6 GPa. Si fijamos el radio interno del tubo en 8.4 nm (ver dibujo en la figura 3.16) y el módulo de Young en 0.6 GPa, encontramos un espesor de pared efectivo de 1.54 nm (Ec. 3.1).

Los valores para la rigidez flexural  $EI$  medidos a partir de los experimentos de *bending* oscilan entre  $1 \times 10^{-24}$  y  $32 \times 10^{-24}$   $\text{Nm}^2$ , situándose la mayoría de las medidas en el valor más alto de este rango [Vanburen 2005]. El módulo de Young efectivo puede ser calculado a partir de los valores de la rigidez flexural. El momento de inercia  $I$  puede calcularse numéricamente con la imagen de la sección transversal de EM utilizada en el modelo de la figura 3.16 resultando en un valor de  $2.7 \times 10^{-32}$   $\text{m}^4$ , el cual predice un módulo de Young entre 0.04 y 1.2 GPa de los experimentos de *bending*. Considerando que la gran mayoría de los valores se encuentran en el extremo más alto, este resultado es consistente con los valores que hemos encontrado a partir de las curvas de indentación, lo cual es importante ya que en los experimentos de *bending* se mide principalmente la elasticidad de curvatura axial de los pfs donde la rigidez flexural está dominada por los propios pfs, mientras que en los experimentos de indentación se mide la elasticidad radial del MT donde la tensión está localizada en las delgadas zonas de conexión entre pfs. La similitud encontrada en los valores obtenidos de  $E$ , sugiere que las propiedades materiales de la tubulina no deben variar considerablemente entre los centros de los pfs y las zonas de unión entre ellos. Los modelos realizados para explicar los resultados de los experimentos de *bending* [Howard 2001] consideran a los pfs como cilindros perfectos unidos unos junto a otros, es decir, no tienen en cuenta las delgadas zonas de unión entre los pfs, por lo que estos modelos deberían ser ampliados para poder incluir los resultados de los experimentos de indentación.

Se han realizado experimentos de compresión de MTs utilizando el AFM con MTs reforzados con glutaraldehído, que actúa como “*cross-linking*” [Vinckier 1996], endureciendo críticamente la estructura del MT. Sin ningún tipo de estabilizador, los MTs se despolimerizan espontáneamente. Por ello se usa el *taxol*, con el fin de estabilizarlos durante el tiempo necesario para realizar el experimento. El efecto del *taxol* en la rigidez de los MT a curvarse es un tema controvertido [Venier 1994; Mickey 1995; Felgner 1996]. Como se mostró en la figura 3.3, el *taxol* estabiliza los contactos laterales de la  $\beta$ -tubulina. Probablemente, esto puede ayudar a mantener a los pfs en una conformación estable [Amos 1999]. El *taxol* es una molécula pequeña, por lo que si se une cerca de los enlaces laterales, no añadirá mucha masa, lo cual sí podría afectar a la respuesta elástica a la indentación radial.

#### 3.4. INTERACCIÓN DE LOS MICROTÚBULOS CON LA PROTEÍNA TAU

Durante la polimerización de los microtúbulos *in vivo* en el interior de la célula se requiere de la ayuda de ciertas proteínas para que este proceso sea rápido y, posteriormente, estabilizar a los MTs. Igualmente, gracias también a la acción de estas proteínas, los MTs se despolimerizan rápidamente cuando la célula lo requiere. Este conjunto de proteínas se llaman proteínas asociadas a los microtúbulos o MAPs. Han sido identificadas varias clases de MAPs con diferentes funciones: proteínas que se unen al extremo negativo del MT, otras que se unen al extremo positivo, otras que actúan como “*cross-linker*”, etc. La proteína motora kinesina es un tipo de MAP que interacciona con la parte superior de los pfs y será estudiada con más detalle en el capítulo siguiente.

Dentro de la gran familia de MAPs encontramos la proteína tau que abunda principalmente en las neuronas, donde su principal función es la estabilización cinética de los MTs axonales. Ciertas modificaciones irreversibles de la proteína tau, como la fosforilación anómala de ciertos aminoácidos, están relacionadas con la pérdida de funcionalidad neuronal y la generación de los filamentos apareados helicoidales, dando lugar a enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [Lee 2001]. La implicación de la proteína tau en el desarrollo de enfermedades degenerativas ha provocado una intensa investigación alrededor de su función en los MTs axonales. Pero

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

---

aún no está claro de qué forma esta proteína se une al MT y si la estabilización cinética del MT, por la acción de la proteína tau, viene acompañada también de cambios en la rigidez mecánica del mismo.

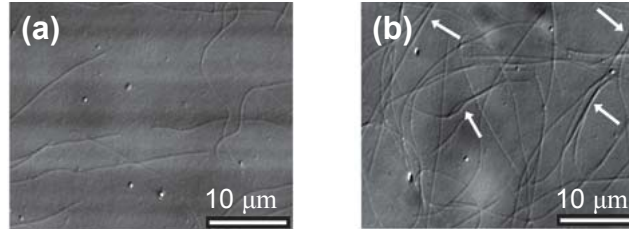
Estudios estructurales, espectroscópicos y bioquímicos sugieren que tau no presenta una forma tridimensional bien definida [Schweers 1994] debido a su carácter altamente hidrofílico [Lee 1988], lo que la ha convertido en la proteína conocida más soluble impidiendo la realización de estudios detallados de su estructura. Estudios de EM han mostrado que tau se une a la parte exterior del MT [Zingsheim 1979; Hirokawa 1988], aunque otros estudios sugieren que también puede unirse parcialmente a la superficie interior [Kar 2003]. La identificación de la región exacta de unión no queda aún clara [Al-Bassam 2002; Santarella 2004], sugiriéndose que tau puede unirse longitudinal y transversalmente a los MTs.

Mediante el uso del AFM en líquidos hemos caracterizado la estructura de los MTs cuando interactúan con la proteína tau así como la forma en que estas interacciones pueden afectar a las propiedades mecánicas de los MTs.

#### 3.4.1. Interacción de tau con los microtúbulos

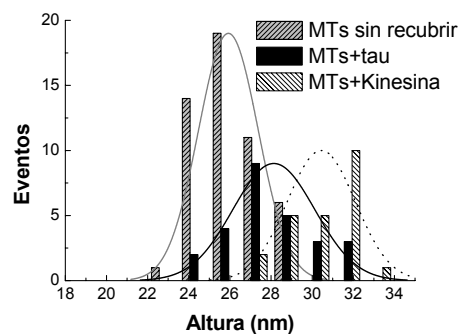
Para la realización de los experimentos hemos empleado seis isoformas de tau purificadas de cerebro porcino de pesos moleculares entre 45 y 65 kDa con el objetivo de simular las condiciones fisiológicas de los MTs unidos a esta proteína de la forma más realista posible. La identidad secuencial entre las proteínas tau de mamíferos es del 90% y entre la  $\alpha$ -tubulina porcina y la humana del 100% (según la base de datos de modelos estructurales de proteínas, PDB), por lo que las proteínas procedentes del cerdo nos proporcionan un sistema general de estudio muy adecuado. Para comprobar que la proteína tau después de la purificación se encuentra biológicamente activa, visualizamos con un microscopio óptico de contraste de interferencia diferencial (DIC) MTs libres de tau y MTs incubados con una alta concentración de tau. Observamos que los MTs sin tau no forman *bundles* (Fig. 3.17.a), mientras que los MTs incubados con tau se agregan en forma de haces o *bundles* (Fig. 3.17.b), lo cual ha sido observado anteriormente [Scott 1992].





**Figura. 3.17.** (a) Imágenes de microscopía óptica DIC de MTs sin tau y (b) de MTs incubados con tau a una concentración de 3/1 (tau/monómeros de tubulina). Las flechas indican los sitios donde se han originado agregados de MTs o *bundles*.

En primer lugar los MTs fueron recubiertos con tau a una concentración de 1/1 (tau/monómeros de tubulina) y en segundo lugar, con una forma troncada de la kinesina-1 dimérica (NcKin) a una concentración de 1/2 (kinesina/dímeros de tubulina). En la figura 3.18 se muestran los histogramas de alturas para MTs recubiertos con tau (26 medidas en 7 MTs), para MTs recubiertos con kinesina (23 medidas en 11 MTs) y para MTs sin recubrir (51 medidas en 31 MTs). Observamos que la altura del MT sin recubrir aumenta de  $25.9 \pm 1.5$  nm a  $28.1 \pm 2.0$  nm cuando se recubre con tau y a  $30.4 \pm 1.7$  nm cuando se recubre con kinesina. El aumento de 2.2 nm en el primer caso se debe a la unión de tau alrededor de toda la estructura cilíndrica del MT. En cambio, el aumento de 4.5 nm en el segundo caso se debe a la unión de kinesina sólo a un lado de la estructura cilíndrica del MT, ya que la kinesina fue añadida a la muestra cuando los MTs se encontraban ya adsorbidos sobre la superficie. Reconstrucciones de EM han mostrado que la unión de cabezas de kinesina provoca un aumento del radio del MT de aproximadamente 4 nm [Hoenger 1995], lo que es consistente con el incremento observado en nuestros experimentos.

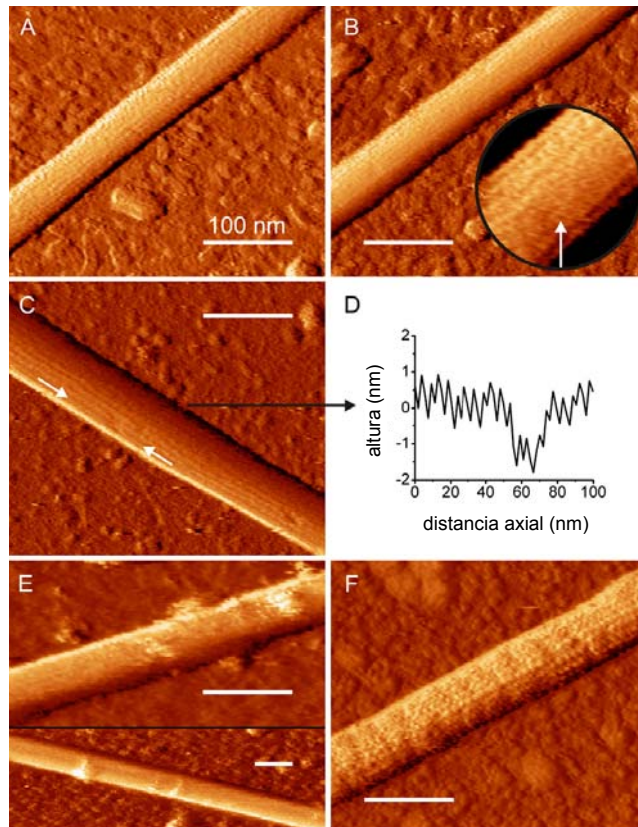


**Figura 3.18.** Histogramas de alturas de MTs sin recubrir (gris), MTs recubiertos con tau (negro) y MTs recubiertos con kinesina (blanco punteado). Cuando los MTs son incubados con tau la altura de éstos aumenta 2.2 nm, mientras que cuando se unen a la kinesina la altura aumenta 4.5 nm. La aplicación del test de t-Student a los histogramas indica con una confianza >99% la significancia estadística entre las tres distribuciones.

En la figura 3.19 podemos observar el efecto de distintas concentraciones de tau en la caracterización estructural del MT. Tanto cuando el MT está sin tau como cuando

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

está recubierto con tau a una concentración 1/1 (tau/monómeros de tubulina), los pfs a lo largo del eje del MT son visibles (Figs. 3.19.a y 3.19.b), indicando que tau no está rellenando los huecos entre pfs.

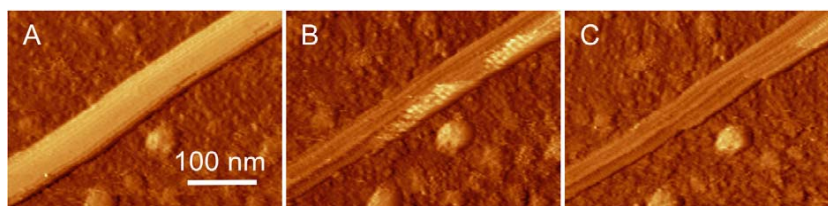


**Figura 3.19.** Imágenes de AFM de MTs. (a) MT sin tau mostrando los pfs. (b) MTs incubados con tau (concentración 1/1 de tau/monómeros de tubulina), donde aún los pfs son visibles. La altura del MT aumenta 2 nm respecto al MT presentado en (a). En la imagen del zoom se observa una fibra vista ocasionalmante (marcada con una flecha) con una altura de ~0.5 nm. (c) MTs incubados a concentraciones más bajas de tau (1/20 de tau/monómeros de tubulina) muestran algunas depresiones en su superficie. (d) Perfil de altura realizado en la zona entre la flechas de la figura (c) donde se observa una depresión en la superficie del MT de longitud ~20 nm y de profundidad ~1 nm. (e) MTs incubados a concentraciones más altas de tau (3/1 de tau/monómeros de tubulina) muestran agregados con alturas entre 3 y 10 nm. (f) MTs recubiertos con kinesina (concentración 1/2 de kinesina/dímeros de tubulina) revelan un patrón distinto con un aumento de altura del MT de ~4 nm.

Ocasionalmente, observamos estructuras fibrosas encima de los MTs (zoom figura 3.19.b) de varias decenas de nanómetros de longitud y con un diámetro aproximado de 0.5 nm, las cuales no se encuentran fijas a la estructura del MT. Esto es consistente con las imágenes de moléculas individuales de tau adheridas en superficies

de mica [Hirokawa 1988]. A concentraciones más bajas de tau, entre 1/40 y 1/3 (tau/monómeros de tubulina), no observamos otra forma diferente de unión de tau al MT pero sí observamos discontinuidades o depresiones en el recubrimiento de la superficie del MT (Fig.3.19.c) de varias decenas de nanómetros de longitud y profundidad entre 0.5 y 2 nm, sugiriendo un recubrimiento no continuo del MT. A concentraciones de tau más elevadas (3/1 o más de tau/monómeros de tubulina) encontramos agregados o parches fijados a la estructura de los MTs con alturas de entre 3 y 10 nm (Fig. 3.19.e). Estos parches son causados probablemente por el exceso de proteína que no encuentra hueco libre en la red del MT y se une formando agregados de tau. Esto proporcionaría un mecanismo de *bundling* o *cross-linking* para el MT, como vimos en la imagen de microscopía óptica DIC (Fig. 3.18.b). El hecho de que la superficie del MT tenga menor definición cuando tiene estos parches es consistente con la estructura altamente desordenada de la proteína tau [Schweers 1994]. Cuando el MT se recubre con kinesina a una concentración 1/2 (kinesina/dímeros de tubulina) el patrón que presenta el MT es muy distinto al que muestra con tau (Fig. 3.19.f).

Para verificar que el aumento del diámetro del MT es causado por la unión de tau a la estructura completa del MT, medimos la altura de diversas capas planas de protofilamentos, es decir, el espesor de la pared de un MT roto sobre la superficie sin tau y otro MT incubado con tau, cuya diferencia proporciona el espesor que añade la proteína tau a la pared del MT (Fig. 3.20).



**Figura 3.20.** Imágenes secuenciales de un MT intacto (a) que se va rompiendo después de múltiples barridos (b y c). La altura de las capas planas de pfs sobre la superficie es medida para MTs sin tau y para MTs incubados con tau (1/1 de tau/monómeros de tubulina), conociéndose así el espesor que añade tau al diámetro del MT.

La altura de estas capas de pfs aumenta de  $4.8 \pm 0.2$  nm para MTs sin tau a  $5.8 \pm 0.6$  nm para MTs incubados con tau (1/1 de tau/monómeros de tubulina). Este aumento de 1 nm demuestra que la proteína tau se encuentra unida debajo de la capa de los pfs y es consistente con el aumento de 2 nm del diámetro total para el MT completo, causado por una capa de espesor de 1 nm alrededor de la estructura cilíndrica del MT. Este

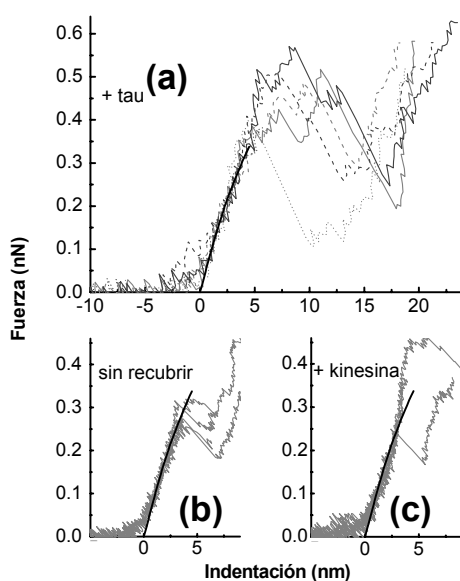
hecho junto a la visibilidad de los pfs en las imágenes de MTs incubados con tau es una fuerte evidencia de que tau se une a la parte exterior de los MTs interaccionando sólo con la parte superior de los pfs y no en los huecos entre ellos.

Cabría preguntarse si el hecho de que tau se una al MT pudiera inducir un aumento en el número de pfs que forman al MT, lo que provocaría a su vez un incremento en el diámetro del MT. El aumento del número de pfs ha sido observado para MTs polimerizados con GMP-CPP (análogo del GTP no hidrolizable) [Meurer-Grob 2001]. Una elevación de 13 a 14 pfs supondría un incremento del 8.5% del diámetro del MT lo que, según la ecuación 3.1, se traduciría en una reducción de la constante elástica de un 11.5%. En el apartado siguiente veremos que esta disminución de la elasticidad no ha sido observada experimentalmente. La hipótesis de un aumento del número de pfs en nuestros experimentos es muy improbable ya que por una parte, los MTs no son polimerizados en presencia de tau sino que son estabilizados con *taxol* antes de añadir la proteína tau y por otra parte, en las imágenes de AFM nunca observamos pfs girados helicoidalmente que es la primera consecuencia del aumento del número de pfs [Meurer-Grob 2001].

#### 3.4.2. Efectos de tau en las propiedades mecánicas de los microtúbulos

Dependiendo de qué modo la proteína tau interaccione con los MTs, las propiedades elásticas de éstos pueden ser afectadas de una u otra manera. Para comprobar el posible cambio de las propiedades mecánicas hemos estudiado la respuesta elástica de MTs incubados con tau bajo la acción de una fuerza aplicada localmente con la punta del AFM en la dirección radial del MT (Fig. 3.5). La deformación de los MTs sin tau mediante una indentación radial está dominada principalmente por los enlaces laterales entre pfs, donde la respuesta elástica lineal es similar a la de un muelle elástico con una constante elástica de muelle de  $0.074 \pm 0.014$  N/m (apartado 3.3). Para MTs incubados con tau (1/1 de tau/monómeros de tubulina) la respuesta a la indentación radial observada es de nuevo lineal con la fuerza hasta los primeros 4 nm de indentación, obteniendo una constante elástica de  $0.077 \pm 0.006$  N/m, la cual es altamente reproducible como se muestra en las curvas de indentación (Fig. 3.21.a). La fuerza de colapso de los MTs con tau es  $0.44 \pm 0.07$  nN, la cual es ligeramente superior a los 0.35 nN encontrados para los MTs sin tau, lo que es

consistente con el aumento de la estabilidad cinética en los MTs con tau para evitar la despolimerización. Sin embargo, esto no implica un cambio de las propiedades elásticas de los MTs. Cuando un MT se despolimeriza los enlaces de tubulina se rompen. Esto puede ser causado por una fuerte deformación mecánica que exceda el régimen de respuesta elástica lineal. Cuando realizamos indentaciones locales sobre un MT para medir su respuesta elástica lineal, estamos midiendo las propiedades elásticas de la pared del MT pero sin llegar a romper los enlaces de tubulina. Pero cuando superamos el régimen lineal éstos se rompen, por lo que sólo la fuerza de rotura, y no la respuesta elástica lineal, debe ser comparada con la estabilidad química del MT. Para la respuesta elástica lineal es importante la cantidad y la geometría de la masa añadida. Por ejemplo, el *taxol* afecta fuertemente a la estabilidad cinética de los MTs pero no afecta en gran medida a su respuesta elástica lineal ya que se trata de una molécula muy pequeña que a penas añade masa sustancial.



**Figura. 3.21.** (a) Respuesta elástica de MTs recubiertos con tau, (b) MTs sin recubrir y (c) MTs recubiertos con kinesina bajo la aplicación de indentaciones radiales. La línea negra en las tres gráficas indica el comportamiento mecánico de un modelo de elementos finitos para un MT recubierto con tau. En (a) y en (c) se han representado seis curvas de indentación. La diferencia del valor medido de  $k$  entre MTs sin tau (0.074 N/m) y MTs con tau (0.077 N/m) está dentro del error experimental, por lo que no es significativa.

El hecho de que la respuesta elástica de los MTs con tau sea cualitativa y cuantitativamente indistinguible en comparación con la encontrada para los MTs sin recubrir con tau (Fig. 3.21.b), a pesar de que su diámetro aumenta 2 nm, nos proporciona otra evidencia de que la proteína tau debe encontrarse unida a lo largo de la parte superior de los pfs y no entre ellos. Para verificar esta hipótesis, realizamos también curvas de indentación sobre MTs recubiertos con kinesina-1 (NcKin) ya que la

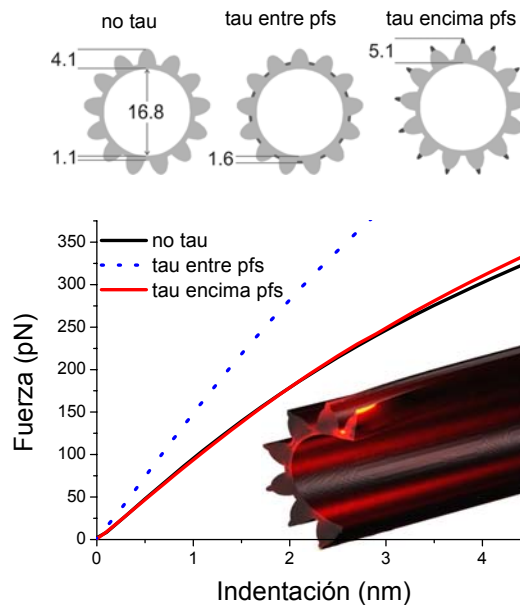
### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

---

unión de esta proteína dimérica a la parte superior de los pfs ha sido observada por criomicroscopía electrónica [Kikkawa 1995], por lo que la unión de la kinesina al MT (concentración 1/2 de kinesina/dímeros de tubulina) no debería causar un cambio sustancial en la respuesta elástica del MT. En la curva de indentación (Fig. 3.21 c) observamos que la respuesta no es lineal cerca del contacto inicial. El MT recubierto con kinesina es más blando al comienzo de la curva y cuando la fuerza aumenta se hace más duro. Este fenómeno puede ser explicado teniendo en cuenta que en este caso la punta contacta con pfs que tienen un espesor superior a 8 nm debido a la unión de la kinesina, por lo que la deformación inicial puede ser descrita por el modelo de Hertz para una indentación en un sólido semi-infinito [Johnson 2001]. Después de la indentación inicial en la pared del MT, la respuesta está dominada por los enlaces laterales entre los pfs. A una indentación aún mayor, las cabezas de kinesina podrían tocarse unas con otras, lo que podría explicar el aumento de la dureza para indentaciones superiores a los 3 nm. Un ajuste lineal de los primeros 0.3 nN resulta en una constante elástica de muelle promedio de 0.08 N/m, lo que demuestra que la adición de una capa de espesor de 4.5 nm encima de los pfs no conlleva un aumento proporcional de la dureza del MT cuando se le somete a una indentación radial.

Para interpretar la respuesta elástica medida experimentalmente y poder evaluar las posibles formas de unión de la proteína tau al MT así como si estas uniones pueden afectar al comportamiento elástico de los MTs, hicimos uso de métodos de elementos finitos para simular las respuesta elástica a indentaciones radiales construyendo un modelo de MT con pfs de la forma indicada en el apartado anterior (Fig. 3.16). Este modelo ha sido modificado para añadir la proteína tau recubriendo el exterior del MT de dos formas distintas: 1) tau es añadida como una capa de espesor de 0.5 nm entre los pfs y 2) tau es añadida formando carriles sólidos de altura de 1 nm encima de los pfs (Fig. 3.22). Las curvas de las simulaciones en la figura 3.22 muestran un fuerte aumento de la dureza del MT cuando la tau se une entre los pfs. En comparación con el MT sin tau hay un aumento de la dureza del 60%, lo cual está muy lejos del error experimental. Tanto la unión de tau en los huecos entre pfs en la parte exterior del MT como la unión de tau en forma de “*cross-linking*” entre pfs en el interior del MT supondría un aumento de espesor efectivo de la pared del MT, que según la ecuación 3.1, provocaría un incremento de la constante elástica que no hemos encontrado

experimentalmente. En cambio, cuando tau se une encima de los pfs la dureza encontrada en este caso, comparada con la del MT sin tau, a penas sufre cambio. Esto es lógico, ya que la respuesta del MT a una deformación radial está dominada por las partes más débiles del MT, las cuales son las zonas de conexión entre pfs. El dibujo de la parte inferior de la figura 3.22 representa el modelo del MT con la proteína tau unida a la parte superior de los pfs, sometido a una indentación radial mostrando la distribución de tensión. Observamos que la tensión mayor, indicada por los colores más brillantes, está concentrada en la región donde se aplica la fuerza y en las zonas de unión entre los pfs.



**Figura 3.22.** Simulaciones de FEM para la respuesta elástica de un MT sin tau (línea negra), para un MT con tau unida entre los pfs (línea azul punteada) y para un MT con tau unida encima de los pfs (línea roja). En la parte superior de la figura se muestra un corte transversal de los modelos utilizados con sus respectivas dimensiones en nm. Para todos los modelos, el módulo de Young del material añadido y del MT es de 0.6 GPa. Las gráficas muestran la deformación para los diversos modelos de MTs cuando son indentados radialmente con una punta parabólica de radio 20 nm. Nótese que cuando tau se une entre los pfs la dureza del MT aumenta un 60%. El dibujo de la parte inferior representa el modelo del MT con tau unida encima de los pfs sometido a una indentación.

En general, cualquier MAPs que interaccione con la parte superior de los pfs no provocará grandes cambios en la elasticidad radial de los MTs mientras que la rigidez flexural probablemente aumentará, lo cual ha sido observado para tau [Mickey 1995;

### 3. Microtúbulos y su interacción con proteínas

---

Felgner 1997]. Por lo que para hacer MTs más rígidos contra la compresión radial, los MAPs deberán rellenar los huecos entre pfs.

Es difícil especular la forma en la que la estabilización mecánica se relaciona con la estabilización cinética. Dado que los MTs se caracterizan por una alta inestabilidad dinámica, cuando se produce la despolimerización de los MTs la energía se almacena probablemente de forma elástica en los dímeros de tubulina, los cuales posiblemente se curvan hacia fuera cuando la molécula de GTP es hidrolizada a GDP en el monómero  $\beta$ -tubulina [Caplow 1994; Desai 1997]. Se ha descrito una correlación entre la unión de muchas proteínas a los MTs y la estabilidad cinética alcanzada, midiéndose esta correlación como un aumento del nivel de nucleación y una reducción de la despolimerización [Drechsel 1992; Faruki 1993; Kowalski 1993; Katsuki 1999]. El mecanismo exacto que usan los MAPs para estabilizar cinéticamente a los MTs no está bien entendido aún. Si hacemos referencia al modelo establecido de los pfs que se curvan hacia fuera parece lógico que la correlación existente entre la respuesta mecánica y la cinética sea compleja. En cualquier caso, dada la importancia fisiológica de la inestabilidad dinámica en los MTs es probable que la función de los MAPs esté más enfocada a regular la inestabilidad dinámica, que a fortalecerlos mecánicamente con fines estructurales, lo cual podría ser realizado de manera más eficiente mediante la formación de *bundles* de MTs.

#### 3.5. RESUMEN

Hemos comprobado que tanto la aplicación de JM como de AM-DAFM, mediante la elección de una micropalanca adecuada y bajo unas ciertas condiciones de operación, permiten obtener imágenes con resolución molecular de la estructura de los MTs en condiciones fisiológicas. Bajo estas condiciones los protofilamentos en la cara exterior de los MTs son claramente resueltos, al igual que los monómeros en la cara interior. La resolución alcanzada con JM es comparable a la obtenida con AM-DAFM.

Hemos estudiado las propiedades mecánicas de MTs individuales mediante la realización de indentaciones radiales con la punta del AFM. Indentaciones del orden de 3.6 nm provocaron una deformación reversible del diámetro del MT de un 15%, resultando en una respuesta elástica lineal. Cuando aplicamos fuerzas del orden de 0.3 nN, las curvas de indentación mostraron una inestabilidad o salto de  $\sim 1$  nm,



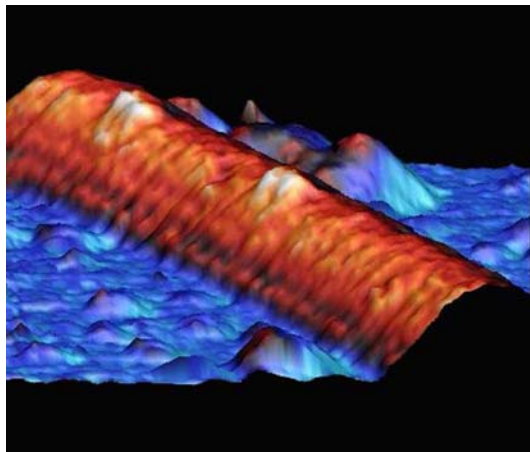
probablemente debido a la ruptura parcial o completa de un pequeño número de enlaces laterales y/o axiales de tubulina. Estas indentaciones son reversibles, obteniéndose en la curva de indentación de vuelta una pequeña histéresis pero sin observarse modificaciones en las imágenes de alta resolución registradas después de las indentaciones, lo cual sugiere la acción de un mecanismo de auto-reparación. Sólo la aplicación de fuerzas superiores a 0.3 nN indujeron daños irreversibles en la estructura del MT, provocando la despolimerización del mismo. Los modelos de los resultados experimentales utilizando FEM sugieren que el modelo correspondiente a un tubo hueco de material homogéneo e isótropo es suficiente para explicar la respuesta elástica lineal encontrada experimentalmente en las curvas de indentación sobre los MTs.

Hemos analizado también la estructura de los MTs en presencia de varias isoformas de la proteína tau con el objetivo de conocer por una parte, cómo esta proteína interacciona exactamente con la red estructural del MT y por otra parte, si esta unión provoca un cambio en la respuesta mecánica del MT. Encontramos que la adición de la proteína tau a una concentración de 1/1 (tau/monómeros de tubulina) origina una capa de espesor de 1 nm alrededor de la estructura cilíndrica del MT y que tau interacciona con la parte superior de los protofilamentos. Los huecos entre los pfs quedan libres, hecho que también se refleja en la alta resolución de los pfs en las imágenes de AFM. La elasticidad radial de los MTs con la proteína tau fue invariable en comparación con la elasticidad radial de los MT sin tau, lo cual es consistente con la unión de tau a lo largo de los pfs. En cambio, este sitio de unión sí provoca un aumento de la resistencia de los MTs contra la ruptura de los enlaces de tubulina. Para confirmar estos resultados estudiamos la elasticidad radial de los MTs cuando éstos interaccionan con la proteína motora kinesina, cuya zona de unión a los MTs tiene lugar en la parte superior de los pfs. De nuevo, en este caso la interacción de esta proteína tampoco afectó a la elasticidad radial de los MTs. Los resultados de las simulaciones utilizando FEM confirmaron la invariabilidad de la elasticidad radial de los MTs obtenida experimentalmente cuando la proteína tau interacciona con la parte superior de los pfs y se une a lo largo de ellos, en vez de rellenar los huecos existentes entre los mismos.



## **CAPÍTULO 4:**

### **MOTORES MOLECULARES: LA KINESINA**



*“Las máquinas microscópicas han de actuar en un mundo caótico. Como no se puede derrotar al caos, hay que tratar de aprovecharlo”, R. D. Astumian.*



#### **4. MOTORES MOLECULARES. LA KINESINA**

La gran mayoría de las máquinas moleculares de la célula, tales como las proteínas, los ácidos nucleicos y complejos de éstos operan en la escala nanométrica, por lo que suelen estar fuera del rango de la resolución alcanzada por microscopía óptica. La kinesina es un motor molecular dímérico que emplea a los microtúbulos como carriles para trasladarse en el interior de la célula. Muchos detalles de sus funciones dinámicas son aún desconocidos y varias las preguntas que quedan abiertas: ¿usa la kinesina uno o dos protofilamentos del microtúbulo en su movimiento? ¿En qué estado químico las dos cabezas del dímero se unen al microtúbulo? La aplicación del AM-DAFM en medio líquido nos permite visualizar la dinámica de este motor molecular a lo largo de los microtúbulos bajo resolución nanométrica con el fin de responder a algunas de estas cuestiones.

##### **4.1. INTRODUCCIÓN A LOS MOTORES MOLECULARES**

La participación de los motores moleculares es esencial en muchos procesos biológicos: el transporte intracelular, el movimiento de bacterias, el mantenimiento de concentraciones fuera del equilibrio a ambos lados de la membrana celular, la lectura y replicación del ADN, la contracción muscular, el empaquetamiento de material genético dentro de algunos virus, etc. Los motores moleculares se pueden clasificar en lineales y rotatorios. Todos ellos se caracterizan por transformar energía química en movimiento.

Recientemente se ha demostrado que un motor viral rotatorio de tamaño nanométrico genera, con relación a su tamaño, el doble de la potencia de un motor de automóvil [Fuller 2007]. Dicho motor es el más fuerte de todos los investigados hasta la fecha, incluyendo el motor que produce la contracción muscular (miosina). Esta propiedad permite al bacteriófago T4 enrollar su genoma (unas 1.000 veces el diámetro

#### 4. Motores moleculares: la kinesina

---

viral) a una velocidad extraordinariamente alta ( $\sim 700$  bp/s). Este descubrimiento puede conducir al desarrollo de mejores vías para el diseño de medicamentos antivirales.

Las proteínas que actúan como motores moleculares en el citoesqueleto se clasifican en diferentes familias de acuerdo con su estructura y función. Las más importantes son las miosinas que interaccionan con los filamentos de actina y son las responsables de la contracción muscular y, las kinesinas y dieninas que interaccionan con los microtúbulos. A su vez, cada uno de estos tres tipos incluye a varias clases. En la actualidad, están identificadas al menos veinte clases de miosinas, diez familias de kinesinas y dos grupos de dieninas. Cada una de estas clases incluye varias decenas de miembros.

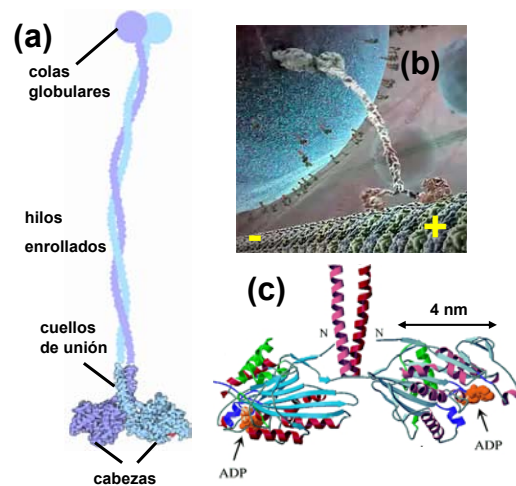
Los motores moleculares constituyen un interesante campo de investigación para la nanotecnología. El diseño de nanomotores permitiría construir nanorobots capaces de realizar toda una serie de funciones que incluso pueden llegar a ser terapéuticas, como el transporte de fármacos y su dosificación a un lugar determinado del organismo. Recientemente, se ha desarrollado una máquina molecular en la que el ADN tiene una doble función, porque sirve de componente estructural y a la vez como combustible [Yurke 2000]. También se ha construido el primer nanomotor rotatorio unidireccional sobre una superficie de nanopartículas de oro que convierten la luz en energía química [van Delden 2005]. Tomando a la naturaleza como fuente de inspiración, un primer reto científico sería fabricar nanomotores artificiales que funcionen con la misma eficacia que en la naturaleza y puedan responder a un estímulo externo de la misma forma que los nanomotores naturales. Para ello, es esencial conocer el complejo y fascinante mecanismo de acción que usan los motores moleculares en los procesos biológicos.

##### **4.2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LA KINESINA**

Las distintas familias de kinesina presentan grandes similitudes estructurales entre sí, aunque sus funciones pueden llegar a ser muy diferentes: transporte de vesículas y orgánulos [Hirokawa 1998], movilidad cromosómica durante la meiosis y mitosis [Endow 1999], desestabilización de MTs [Desai 1999], función flagelar y ciliar [Nonaka 1998], etc. Esta variedad muestra la gran importancia de estos motores moleculares en la célula. La procesividad de estos motores proteicos se define como la

habilidad de realizar movimiento continuo sobre el MT durante un largo trayecto. En la familia de la kinesina existen miembros que son procesivos y otros que no lo son. El combustible bioquímico que usan estos motores proteicos proviene de la hidrólisis del nucleótido adenosín trifosfato (ATP). Cuando éste se hidroliza en una región específica de la proteína motora pasa a convertirse en adenosín difosfato (ADP) más fosfato (P) liberando una energía de  $\sim 7.7$  Kcal/mol. El ADP suele ser reciclado en la mitocondria, mediante la acción un motor rotatorio de membrana, para volver a emerger como ATP [Sambongi 1999]. De esta forma, la energía química se convierte en trabajo mecánico.

La kinesina convencional está sólo presente en las células eucarióticas y se mueve a lo largo de los MTs, a los que utiliza como carriles para transportar cargas como vesículas, proteínas u otros orgánulos en el interior de la célula. Se trata de una proteína dimérica, en la que cada monómero está compuesto por: una cabeza de diámetro  $\sim 4$  nm (*heavy chain*), un cuello de unión entre la cabeza y el resto del cuerpo (*neck linker*), un filamento o hilo largo enrollado helicoidalmente con el filamento del otro monómero formando un tallo flexible (*stalk coiled-coil*) y, una cola (*tail*) con una terminación globular (*light chain*) (Fig.4.1.a).



**Figura 4.1.** (a) La kinesina dimérica consiste de dos cabezas, un tallo largo formado por dos hilos enrollados helicoidalmente entre sí y una cola con dos terminaciones globulares. Imagen de PDB 3kin. (b) Las cabezas sirven como “pies” para caminar sobre el MT gracias a la hidrólisis del ATP, uniéndose siempre a la  $\beta$ -tubulina. La kinesina convencional transporta cargas y camina desde el extremo negativo hacia el positivo. Las terminaciones globulares de las colas son la zona de apoyo para la carga. La imagen pertenece a la animación Cellular Visions: “The inner Life of the Cell”, Studio Daily, Harvard University, 2006. (c) Estructura atómica de las cabezas y cuellos de la kinesina convencional. En color naranja se muestran las moléculas de ADP unidas a las cabezas.

La estructura atómica de la kinesina dimérica y del cuello han sido resueltas por cristalografía de rayos-X [Kozielski 1997] (Fig. 4.1.c). Las cabezas tienen una región cargada positivamente, lo que hace que se unan específicamente a la  $\beta$ -tubulina de la red del MT que está cargada negativamente [Fan 1996]. Dado que los dímeros de tubulina son asimétricos, lo cual proporciona polaridad al MT, la gran mayoría de las kinesinas caminan en un sólo sentido sobre el MT, desde el extremo negativo hacia el positivo (Fig. 4.1.b). En cada cabeza se encuentra el dominio catalítico o motor, con las regiones de unión al MT y al ATP bien diferenciadas, así que la cabeza puede perder ADP sin separarse del MT. Debido a esto, la kinesina puede realizar un movimiento procesivo. El cuello de unión parece estar implicado en la procesividad [Hancock 1998], en los cambios conformacionales del dominio catalítico [Case 2000] y en la regulación de la hidrólisis del ATP [Jiang 1997]. El tallo tiene una longitud del orden de 100 nm y adopta la forma de *coiled-coil* que confiere a la kinesina su carácter de proteína dimérica. Las colas con las terminaciones globulares de ambos monómeros son las responsables de la unión de la carga a la kinesina [Seiler 2000] (Fig. 4.1.b).

#### 4.3. MODELOS DEL MOVIMIENTO DE LA KINESINA

Conocer los mecanismos de la kinesina para moverse a lo largo de los MTs es fundamental para poder entender cómo realiza sus funciones básicas en el interior de las células. Los modelos para el movimiento de las proteínas motoras se proponen en función de si los motores son o no procesivos. El movimiento en todos estos modelos se produce a través de la hidrólisis del ATP.

- Mecanismos no procesivos: las kinesinas no procesivas se unen a un protofilamento (pf) del MT, hidrolizan una molécula de ATP, se disocian del MT y se mueven por difusión hacia otro pf diferente [Hancock 1998]. Así los pasos que realizan a lo largo del MT no son regulares, sino estocásticos. Los motores no procesivos actúan de forma cooperativa [Higuchi 2002].

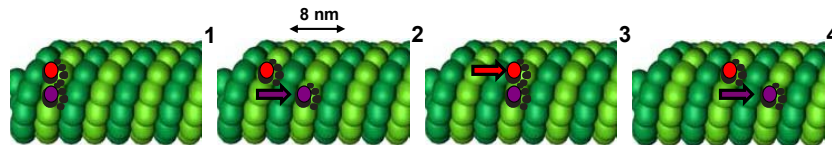
- Mecanismos procesivos: los experimentos de la movilidad *in vitro* de la kinesina convencional (kn) muestran su carácter procesivo [Block 1990] con pasos de 8 nm [Svoboda 1993]. En su movimiento a lo largo del MT la kn se une a la  $\beta$ -tubulina [Song 1993] con una afinidad al MT que depende del estado químico del nucleótido. En cada uno de esos pasos se consume una molécula de ATP [Hua 1997; Schnitzer 1997].



Otros experimentos bioquímicos muestran que la kn hidroliza un promedio de 125 moléculas de ATP sin disociarse del MT [Hackney 1995] lo que equivale a cubrir una distancia de 1000 nm (1ATP/8nm) antes de disociarse del MT, demostrando así que la kn es altamente procesiva. La kn avanza siguiendo un camino paralelo al eje del MT [Ray 1993], para lo cual puede usar uno o dos pfs a lo largo del movimiento. La kn utiliza las dos cabezas para caminar manteniendo un alto grado de coordinación entre ambas, pero el mecanismo empleado para avanzar sin disociarse del MT aún no está claro. Existen principalmente dos modelos que describen la procesividad.

#### 4.3.1. Modelo “inchworm”.

En el modelo “*inchworm*” [Hua 2002] las dos cabezas de la kn dimérica son funcionalmente diferentes, ya que siempre conservan posiciones no equivalentes sin intercambiar sus lugares a lo largo del recorrido. Una cabeza va siempre delante de la otra y cada cabeza se mueve 8 nm hacia delante (Fig. 4.2). Sólo la cabeza que va por delante es la que realiza la hidrólisis del ATP y siempre es la misma. Existen evidencias experimentales que indican que ambas cabezas de la kn pueden unirse al MT e hidrolizar ATP [Hackney 1994; Hackney 1994]. En este tipo de procesividad no hay rotación del cuello. A pesar de que las cabezas no son equivalentes, el mecanismo de este modelo implica una equivalencia en los pasos.



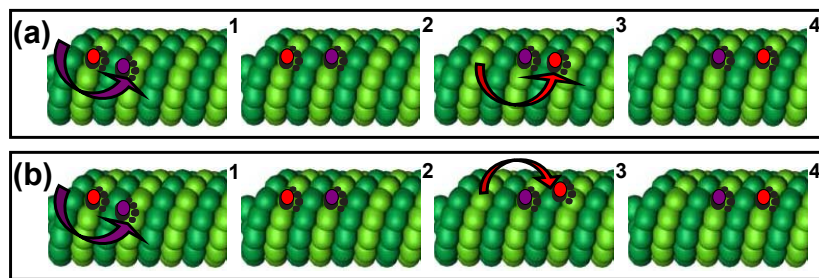
**Figura 4.2.** Modelo “*inchworm*”. Una cabeza va siempre por delante (violeta) y es la única que realiza la hidrólisis del ATP. La otra cabeza (roja) permanece siempre detrás de la primera (compárense las secuencias 2 y 4). Dado que las cabezas no intercambian sus papeles en todo el recorrido, no se espera que haya ninguna rotación del cuello. Las cabezas no son equivalentes, aunque los pasos sí lo son.

#### 4.3.2. Modelo “hand-over-hand”.

En el modelo “*hand-over-hand*” [Yildiz 2004] las dos cabezas de la kn dimérica son funcionalmente equivalentes, alternando la posición en el movimiento y en la hidrólisis del ATP. La cabeza delantera del dímero permanece unida fuertemente al MT, mientras que la que está detrás de la primera se suelta del MT. Esta cabeza se mueve hacia delante sobre una distancia de 16 nm, donde se une de nuevo al MT, por lo que ahora ha pasado a ser la cabeza delantera y se encargará de realizar la siguiente

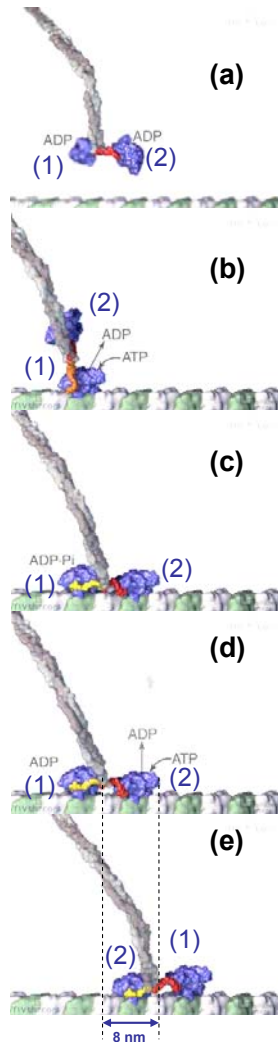
#### 4. Motores moleculares: la kinesina

hidrólisis de ATP. El centro de masas del dímero se ha movido 8 nm sobre el MT consumiendo una molécula de ATP. Ambas cabezas realizan las mismas funciones, pero no al mismo tiempo, lo cual no sería posible si no estuviesen coordinadas. El movimiento hacia delante de la cabeza trasera puede ser realizado de dos formas distintas: 1) en sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario al de las agujas del reloj, pero siempre en el mismo sentido. A este movimiento se le denomina modelo “*hand-over-hand simétrico*” (Fig. 4.3.a) e implica una rotación del cuello de 180° en cada de paso [Howard 1996]. En este modelo las dos cabezas son funcionalmente equivalentes y los pasos también lo son.; 2) alternando el movimiento entre el sentido de las agujas del reloj y el sentido contrario al de las agujas de reloj. A este otro movimiento se le denomina modelo “*hand-over-hand asimétrico*” (Fig. 4.3.b) suprimiéndose la rotación del cuello de 180° [Asbury 2003]. En este modelo las dos cabezas son funcionalmente equivalentes, pero no hay una equivalencia en los pasos.



**Figura 4.3.** Modelos “*hand-over-hand*”, las cabezas son funcionalmente equivalentes y se alternan en el movimiento e hidrólisis del ATP. (a) Modelo “*hand-over-hand simétrico*”, los pasos son equivalentes, donde el movimiento hacia delante de la cabeza trasera (marcado con una flecha) siempre se realiza por el mismo lado, implicando una rotación del cuello de 180° en cada paso (compárense las secuencias 1 y 3). (b) Modelo “*hand-over-hand asimétrico*”, los pasos no son equivalentes, donde el movimiento hacia delante de la cabeza trasera (marcado con una flecha) alterna el sitio por el que pasa en cada paso, anulándose así la rotación de 180° del cuello (compárense las secuencias 1 y 3). En cada caso el centro de masas del dímero se desplaza hacia delante una distancia de 8 nm.

El ciclo mecánico-químico de los cambios conformacionales que sufren las cabezas de kn en el modelo “*hand-over-hand*” se muestra en la figura 4.4. Las cabezas en disolución contienen una molécula de ADP cada una (Fig. 4.4.a). El dímero de kn se une al MT, donde las cabezas con ADP tienen una afinidad débil con el MT.



**Figura. 4.4.** Ciclo mecánico-químico en el movimiento procesivo de la kinesina basado en un mecanismo “*hand-over-hand*”. (a) Ambas cabezas (azules) contienen ADP en disolución y están unidas al tallo largo *coiled-coil* (gris) a través de los cuellos de unión (rojo). (b) La primera cabeza se une débilmente a la  $\beta$ -tubulina, su molécula de ADP es expulsada para capturar una molécula de ATP. (c) En la primera cabeza comienza la hidrólisis del ATP a ADP+P, mientras que la segunda se une débilmente por delante de la primera al MT. (d) La hidrólisis del ATP provoca cambios conformacionales en el cuello de la primera cabeza (ahora de color amarillo). La segunda cabeza expulsa la molécula de ADP y toma otra de ATP, uniéndose fuertemente al MT. (e) Los cambios conformacionales inducidos en la primera cabeza hacen que ésta sea impulsada fuertemente hacia delante recorriendo 16 nm para unirse a la siguiente  $\beta$ -tubulina. El centro de masas del dímero se ha desplazado 8 nm (ver las líneas punteadas en las imágenes (d) y (e) que indican esta distancia). Ahora, la primera cabeza comienza el ciclo descrito de nuevo para que la segunda cabeza pueda realizar un paso hacia delante. De esta forma, la kinesina va caminando a lo largo del MT mediante pasos de 8 nm. Nótese la alta coordinación de los movimientos de una cabeza respecto a la otra. Las imágenes pertenecen a la animación creada por Vale. R. et al, [www.scripps.edu/cb/milligan/](http://www.scripps.edu/cb/milligan/).

La primera cabeza pierde su ADP y recibe ATP, por lo que se une al MT (Fig. 4.4.b). La segunda cabeza se une débilmente al MT, mientras que en la primera cabeza se produce la hidrólisis del ATP (Fig. 4.4.c). Esto provoca un cambio conformacional en el cuello de esta cabeza mientras que de la segunda cabeza, que ahora está en primer lugar, escapa ADP y recibe ATP uniéndose fuertemente al MT (Fig. 4.4.d). En este momento la primera cabeza ya tiene suficiente energía para ser impulsada hacia delante 16 nm uniéndose de nuevo al MT (Fig. 4.4.e). La segunda cabeza hidroliza su molécula de ATP y el proceso se repite nuevamente, llevándose a cabo el movimiento procesivo de la kn en el que se consume una molécula de ATP en cada paso realizado a lo largo

del MT. La comunicación entre las dos cabezas, necesaria para ir alternando su unión al MT, puede ser debida a fuerzas transmitidas a través de ciertas regiones en los cuellos de unión de las dos cabezas [Hancock 1998], aunque el alto grado de coordinación existente entre las dos cabezas todavía no se entiende claramente.

Estudios experimentales han mostrado la inexistencia de la rotación del cuello de 180° [Hua 2002], que junto a otros experimentos, sugieren una clara evidencia del uso de un mecanismo basado en el modelo “*hand-over-hand asimétrico*” para el movimiento procesivo de la kn [Asbury 2003; Kaseda 2003]. El mecanismo utilizado en este modelo es similar al mecanismo empleado por el ser humano para caminar, con la diferencia de que la estructura de la kn no presenta una simetría bilateral [Kozielski 1997]. Sin embargo, una de las cuestiones que todavía permanece abierta es si la kn utiliza un único pf o dos pfs paralelos para realizar su movimiento procesivo a lo largo del MT. Imágenes de EM de reconstrucciones helicoidales de MTs recubiertos con altas concentraciones de kinesina muestran evidencias de la unión a lo largo de un único pf [Skiniotis 2003]. Pero la visualización directa del movimiento no ha sido posible aún debido a la alta resolución espacial que ello supone. El AFM nos ofrece la posibilidad de estudiar el movimiento dinámico de sistemas moleculares con una alta resolución espacial [Moreno-Herrero 2005].

#### 4.4. RECUBRIMIENTO DE MICROTÚBULOS CON KINESINA

Nuestro primer objetivo es estudiar si las cabezas de kinesina unidas a la estructura de los MTs originan algún patrón característico que podamos reconocer. De esta forma podremos saber si los dímeros de kn se unen paralelos al eje axial del MT. Para recubrir los MTs con kn vamos a usar un análogo al ATP pero que es no hidrolizable, el adenilil imidodifosfato (AMP-PNP). Así impediremos el movimiento de la kn, el cual sólo ocurre en presencia de ATP. El recubrimiento de MTs con kn en presencia de AMP-PNP ha sido estudiado previamente [Kacher 2000], pero la gran mayoría de los MTs observados se encontraban abiertos sobre la superficie y la resolución alcanzada no fue suficiente para distinguir si las cabezas de un dímero de kn estaban alineadas a lo largo de un único pf o si se encontraban unidas a dos pfs vecinos.

En todos los experimentos realizados para estudiar la interacción de la kinesina con los microtúbulos así como su dinámica a lo largo de éstos hemos utilizado la

kinesina *Neurospora crassa* (NcKin433), que es un miembro de la familia de la kinesina-1 [Lawrence 2004]. La NcKin433 usada en nuestros experimentos está truncada, sólo consta de las dos cabezas, cuellos de unión y una pequeña longitud del tallo *coiled-coil*. El resto del tallo, así como las colas con las terminaciones globulares han sido eliminados. Este tipo de construcción forma motores diméricos que son altamente procesivos [Kallipolitou 2001].

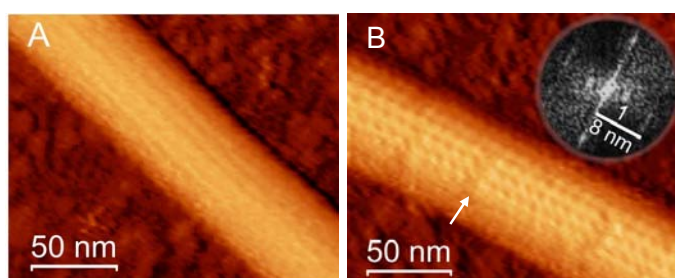
La aplicación del AFM en este trabajo se ha realizado íntegramente empleando el modo de medida AM-DAFM en medio líquido con una micropalanca pequeña [BL-RC150VB] a temperatura ambiente. Como vimos en el capítulo anterior, el uso del AM-DAFM en líquidos con este tipo de micropalanca permite alcanzar una alta resolución molecular de los MTs, comparable a la obtenida con JM. ¿Puede afectar la fuerza ejercida por la punta del AFM durante el barrido a la unión y movimiento de los motores sobre el MT? Este efecto va a depender de la dirección y magnitud de la fuerza, así como de la duración y ritmo de la fuerza aplicada. Controlando las condiciones de operación del AM-DAFM en líquidos podremos trabajar con fuerzas aplicadas muy bajas. En todos los experimentos vamos a usar una amplitud de oscilación para la micropalanca de  $\sim 5$  nm, lo que supone trabajar con fuerzas del orden de 60 pN (apartado 2.4). En los experimentos de trampas ópticas se emplean fuerzas alrededor de 10 pN, las cuales son aplicadas paralelas al eje del MT para tirar de las kinesinas unidas a la superficie de éste, con un ritmo de la fuerza aplicada entre 2 y 18 pN/s [Kawaguchi 2001]. Las fuerzas utilizadas en nuestros experimentos son mayores a las usadas en los de trampas ópticas, pero hay que tener en cuenta que en nuestro caso las fuerzas son aplicadas perpendicularmente al eje del MT y durante un tiempo de  $\sim 125$   $\mu$ s en cada ciclo de oscilación. Este tiempo es despreciable comparado con los 20 o 30 s que tarda en adquirirse una imagen completa. El ritmo de la fuerza aplicada en nuestro caso es  $\sim 0.5$   $\mu$ N/s. La probabilidad de arrastrar las kinesinas es inversamente proporcional al ritmo de la fuerza aplicada [Merkel 1999], por lo que la fuerza para romper la interacción MT-Kn debe ser superior al rango de fuerzas utilizado en nuestros experimentos. De hecho, manteniendo la fuerza aplicada alrededor de 60 pN, obtuvimos decenas de imágenes de la misma zona de uno MT recubierto con kn sin eliminar o desplazar los motores de la superficie. La unión de la kn a la superficie del

MT en presencia de AMP-PNP es considerada prácticamente irreversible [Hirose 1995].

##### 4.4.1. Recubrimiento en condiciones de saturación

En el capítulo anterior comprobamos que la adición de kn en una proporción equimolar con los dímeros de tubulina en presencia de AMP-PNP aumenta la altura de los MTs entre 4 y 4.5 nm, lo cual indica que sólo el lado expuesto del MT es recubierto con una única capa de dímeros de kinesina.

La figura 4.5.b muestra el patrón característico de la superficie de un MT recubierto con kn con una periodicidad axial de 8 nm, el cual difiere considerablemente de la superficie del MT sin recubrir (Fig. 4.5.a). Esto indica que cada cabeza de kn está unida a un dímero de tubulina. La periodicidad axial de 8 nm encontrada en los MTs recubiertos a concentraciones equimolares ha sido también confirmada mediante criomicroscopía electrónica [Harrison 1993].

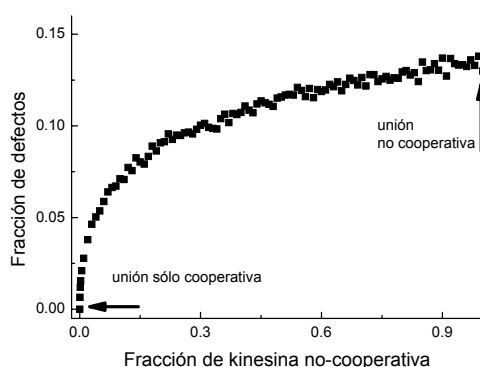


**Figura. 4.5.** (a) Imagen de AFM de un MT sin recubrir. Se observan cuatro pfs paralelos al eje axial del MT. (b) Imagen de AFM de un MT recubierto con kn a una concentración de 1motor/2dímeros de tubulina en presencia de 15  $\mu$ M de AMP-PNP. Los tres pfs de la parte superior muestran las cabezas de kn individuales. La flecha marca la posición de uno de los defectos en la red de recubrimiento o decoración del MT. En la transformada de Fourier 2-D observamos la periodicidad axial de 8 nm.

El MT sin recubrir (Fig. 4.5.a) muestra muy poca corrugación en la dirección axial pero sí se distinguen claramente los huecos entre los pfs. En cambio, el MT recubierto con kn muestra una estructura axial bien definida debido a la unión de las cabezas de kn (Fig. 4.5.b). Aunque no pudimos identificar dímeros individuales de kn en estos MTs saturados con kn, sí encontramos una evidencia indirecta del modo de unión de la kn a la pared del MT en el estado AMP-PNP. En concreto, encontramos un patrón axial predominante de 8 nm creado por las cabezas de kn, en el que también observamos defectos en la red de los motores unidos (Fig. 4.5.b, indicado por la flecha). Los defectos tienen típicamente una dimensión axial de 16 nm entre las

cabezas, lo que corresponde al espacio de un dímero de tubulina sin ocupar. Estos defectos han sido observados también en imágenes de EM [Skinotis 2003].

En biología, conocer el grado de cooperatividad de las enzimas o moléculas (kns) es importante ya que nos da una medida de si cambia su afinidad para unirse a un sustrato (los MTs) en función de la cantidad de moléculas unidas ya al mismo. La cooperatividad puede ser positiva o negativa. El análisis de la frecuencia a la que ocurren los defectos en la red de decoración del MT por kn nos permite dar una conclusión sobre la cooperatividad de los motores en esta unión. Una unión aleatoria de los dímeros de kn al MT debería producir una densidad promedio de los defectos bien definida, mientras que si hay un aumento de la cooperatividad, la densidad de los defectos debería reducirse eventualmente a cero, ya que la superficie del MT se empezará a recubrir de kn a partir de una primera posición de ésta. De los casi 427 dímeros de tubulina que analizamos en todas las imágenes obtenidas, encontramos 54 defectos aislados, es decir, un 12.6% del número total de dímeros de tubulina. Para estimar la densidad máxima de defectos, representamos una simulación de Monte Carlo (Fig. 4.6), donde usamos 50.000 zonas de unión (dímeros de tubulina) dispuestas a lo largo de un protofilamento. Para una unión aleatoria de los dímeros de kn encontramos un 13.5% de defectos en la decoración. En cambio, para una unión cooperativa, el número de defectos decreció, disminuyendo eventualmente a cero, como era de esperar. La frecuencia de los defectos observada en los experimentos (12.6%) es consistente con una falta de cooperatividad en la unión de dímeros de kn en la dirección axial del MT.

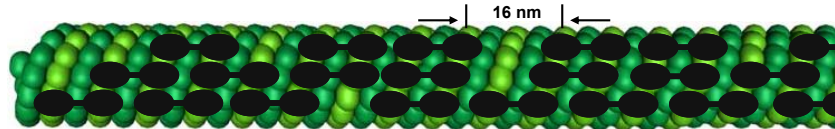


**Figura. 4.6.** Resultados de la simulación para la decoración de un MT representada con 50.000 dímeros de tubulina dispuestos a lo largo de un pf. La fracción de dímeros de tubulina sin ocupar, es decir, los defectos, es una función de la probabilidad de la unión no cooperativa.

El número de cabezas encontradas en las imágenes de AFM entre defectos es casi siempre un número par, lo cual sugiere claramente que los motores en el estado

#### 4. Motores moleculares: la kinesina

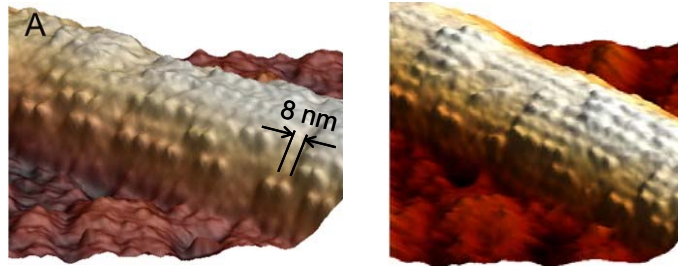
AMP-PNP interaccionan con el MT manteniendo ambas cabezas unidas a lo largo de un único pf (Fig. 4.7). Esto es consistente con el hecho de que la fuerza para arrancar un dímero de kn sea el doble en presencia de AMP-PNP que en presencia de ATP o libre de nucleótido [Kawaguchi 2001].



**Figura 4.7.** Dibujo ilustrativo de la unión aleatoria de dímeros de kn al MT. Se observan 64 dímeros de tubulina y 8 defectos, es decir, un 12.5 % del número total de dímeros. Cada defecto corresponde a un hueco de 16 nm, lo que equivale a un dímero de tubulina sin ocupar. Cada motor mantiene sus dos cabezas unidas a lo largo de un único pf.

##### 4.4.2. Recubrimiento con motores individuales

Para reafirmar la conclusión extraída de las imágenes de MTs saturados de motores, en las que no pudimos identificar dímeros individuales, utilizamos una concentración de motores intermedia ( $\sim 1$ motor/3dímeros de tubulina) para obtener de nuevo imágenes en el estado AMP-PNP. De esta forma, el grado de recubrimiento de los MTs es menor y las cabezas de kn individuales son más fáciles de distinguir (Fig. 4.8.a y 4.8.b).



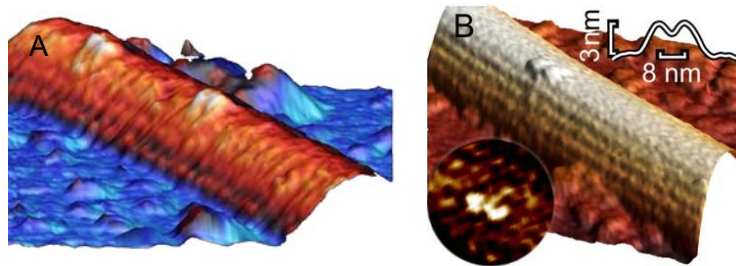
**Figura 4.8.** (a) y (b) Imágenes de AFM en 3D de un MT recubierto con una concentración intermedia de motores ( $\sim 1$ motor/3dímeros de tubulina) en presencia de  $15 \mu\text{M}$  de AMP-PNP. Los motores individuales son claramente resueltos, las cabezas siempre aparecen en pares alineadas paralelas al eje del MT y con una separación entre ellas de 8 nm. El tamaño y número de píxeles de las imágenes es de  $156 \times 156 \text{ nm}$  y  $128 \times 128$  píxeles respectivamente.

En las imágenes obtenidas observamos 60 pares de cabezas individuales con una distancia de 8 nm entre cabezas pertenecientes a un dímero, unidas a lo largo de pfs individuales (Fig. 4.8.a). En ninguna de las imágenes encontramos motores con una cabeza unida a un pf y la otra unida a un pf vecino.

Para conseguir MTs con un grado de recubrimiento menor utilizamos una concentración de motores más baja que la anterior ( $\sim 1$ motor/10dímeros de tubulina)



para obtener imágenes en el estado AMP-PNP. En la figura 4.9.a se muestran dos motores aislados con sus respectivas cabezas unidas a lo largo de un único pf. En otro MT diferente encontramos un motor individual (Fig. 4.9.b) también con ambas cabezas unidas a un mismo pf. La altura promedio (número de medidas  $n = 17$ ) encontrada de los motores individuales observados sobre distintos MTs es de  $3.7 \pm 0.5$  nm, la cual es ligeramente menor que los 4.5 nm de altura medidos en los MTs recubiertos con concentraciones altas de motores. La pequeña discrepancia puede ser debida al aumento de libertad de los motores individuales para doblarse ya que no tienen vecinos alrededor. Ocasionalmente, en las imágenes observamos una fibra de longitud de  $\sim 10$  nm desde las cabezas unida lateralmente al MT, que podría representar el tallo corto que conserva la NcKin433 truncada (Fig. 4.9.b, zoom).



**Figura. 4.9.** Imágenes de AFM en 3D de MTs recubiertos con una concentración baja de motores ( $\sim 1$  motor/10 dímeros de tubulina) en presencia de  $15 \mu\text{M}$  de AMP-PNP. (a) Dos motores aislados son resueltos con sus cabezas alineadas a lo largo de un pf. (b) Un motor individual aislado con ambas cabezas unidas al mismo pf. La gráfica de la parte superior muestra un perfil topográfico promedio sobre 17 dímeros de kn en la dirección axial, resultando una distancia entre cabezas de 8 nm y una altura de 3.7 nm. El zoom en la parte inferior muestra las dos cabezas del dímero y una estructura de longitud  $\sim 10$  nm. El tamaño y número de píxeles es de  $200 \times 200$  nm y  $128 \times 128$  píxeles respectivamente.

Las imágenes obtenidas demuestran que los dímeros de kn aislados son perfectamente resueltos con AM-DAFM en líquidos y que permanecen unidos con ambas cabezas a lo largo de un único pf al MT en el estado AMP-PNP, siendo la distancia entre ellas de 8 nm. Este resultado responde sin ambigüedad a la cuestión planteada sobre cómo la kn interacciona con la superficie del MT.

Hemos encontrado una clara relación entre la proporción de motores y dímeros de tubulina utilizada y el grado de recubrimiento alcanzado de los MTs en los experimentos, extendiéndose desde MTs completamente recubiertos hasta la perfecta resolución de las cabezas de motores individuales aislados.

##### 4.5. MOVILIDAD DE MOTORES DE KINESINA INDIVIDUALES

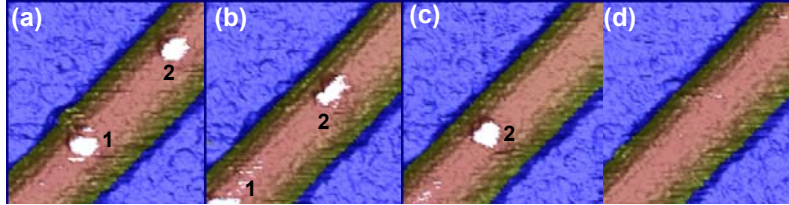
El problema planteado ahora es saber si los dímeros de kn utilizan también un único pf o dos pfs adyacentes en su movimiento procesivo a lo largo de los MTs. La velocidad de los motores depende crucialmente de la concentración de ATP en la disolución. La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) da una medida de la concentración del sustrato (ATP) a la cual la velocidad de una reacción enzimática (la hidrólisis del ATP por las cabezas de kn) alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima. Esta constante ha sido medida para la NcKin433 ( $\sim 200 \mu\text{M}$  ATP) resultando ser un orden de magnitud mayor que para la kinesina-1 humana [Steinberg 1996]. Esto va a permitirnos obtener una disminución relativa de la velocidad de Nckin433 para bajas concentraciones de ATP. Normalmente en nuestros experimentos vamos a utilizar una concentración de  $0.5 \mu\text{M}$  ATP.

Para poder observar pasos individuales de la kn sobre el MT en una secuencia de imágenes o película registrada con el AFM, la velocidad de cada una de las imágenes debería ser aproximadamente igual a la frecuencia de los pasos de la kn. El uso de micropalancas muy pequeñas con altas frecuencias de resonancia ( $\sim 300 \text{ KHz}$ ) permitiría obtener múltiples imágenes por segundo [Ando 2003] pero a costa de sacrificar la resolución en las imágenes. La velocidad de barrido máxima que hemos conseguido usando AM-DAFM en líquidos con las micropalancas [BL-RC150VB] es del orden de  $4 \mu\text{m/s}$ . Esto permite disminuir el tiempo de adquisición de una imagen típica, con un área de  $150 \text{ nm}^2$  y  $64 \times 64$  píxeles, a 3 segundos. De esta forma pudimos barrer la misma zona de un MT decenas de veces sin causar daños en su estructura. Sin embargo, la mayoría de las películas fueron registradas con más píxeles y velocidades más bajas para conseguir una mayor resolución.

##### 4.5.1. Movilidad de motores individuales

Para estudiar con el AFM el movimiento procesivo de motores individuales a lo largo del MT, la concentración de motores debe ser baja, por lo que vamos a usar una concentración de  $\sim 1$  motor/10 dímeros de tubulina. En la figura 4.10 se muestra una secuencia de imágenes pertenecientes a una película. En ellas observamos cómo dos motores se mueven unidireccionalmente hacia el extremo inferior de la imagen a lo largo del MT. El tiempo de adquisición de cada imagen es de 33 s. Desde la imagen (a) hasta la imagen (b) el primer motor ha avanzado  $71 \text{ nm}$ , lo que equivale a caminar  $\sim 9$

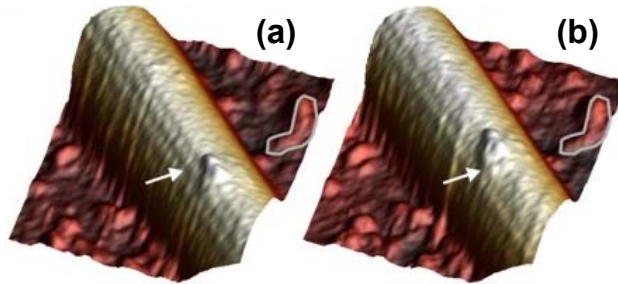
pasos, y el segundo motor ha avanzado 60 nm, es decir, ha caminado entre 7 y 8 pasos. Esto indica que cada paso es realizado en tan sólo 5 segundos.



**Figura 4.10.** Movilidad de motores individuales a lo largo de un MT. (a) Dos dímeros de kn (color blanco) avanzan hacia el extremo inferior de la imagen sobre un MT. (b) El motor 1 ha casi desaparecido de la imagen, mientras que el segundo ha avanzado 60 nm. (c) El primer motor ha desaparecido completamente del área de visión y el segundo sigue avanzando. (d) El segundo motor ha desaparecido también. El tamaño y número de píxeles es de 200×200 nm y 128×128 píxeles respectivamente.

En todos los experimentos realizados la velocidad de los motores oscila entre 2 y 5 nm/s. Esta variación es consistente con la distribución exponencial esperada en los intervalos de los pasos a concentraciones límites de ATP [Schnitzer 1997], como las utilizadas en nuestros experimentos.

Para incrementar la posibilidad de encontrar motores aislados y poder disminuir su velocidad, añadimos una concentración de 15  $\mu$ M de AMP-PNP a la muestra preparada de MTs con kn y ATP. En la figura 4.11 se muestran dos imágenes consecutivas de un motor individual incubado con este tipo de preparación.



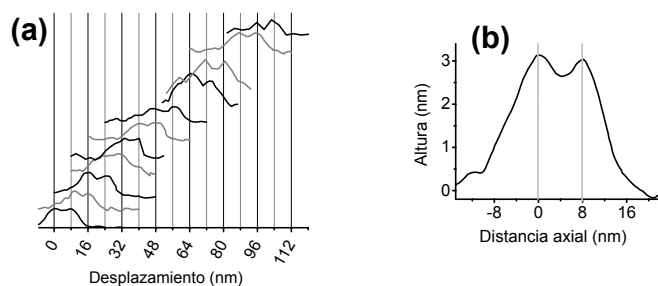
**Figura 4.11.** Movilidad de un motor aislado a lo largo de un único pf. (a) Un motor con las dos cabezas visibles camina hacia la parte superior de la imagen. (b) El motor recorre una distancia de 16 nm. La posición de las flechas en ambas imágenes está fija para dar cuenta de la longitud recorrida. El tamaño y número de píxeles es de 200×200 nm y 128×128 píxeles respectivamente.

El motor está unido a lo largo de un único pf (Fig. 4.11.a) y posteriormente realiza un movimiento hacia la parte superior de la imagen recorriendo una distancia de 16 nm (Fig. 4.11.b), lo que equivale a caminar 2 pasos, continuando en el mismo pf de la imagen anterior. El tiempo de adquisición de cada imagen fue de 87 s. Después de

#### 4. Motores moleculares: la kinesina

recorrer esta distancia el motor se queda parado en esa posición, probablemente debido a la concentración relativamente alta de AMP-PNP que hay en la disolución. En este caso, la velocidad del motor se ha reducido a 0.2 nm/s por lo que tarda unos 40 s en realizar cada paso.

En total encontramos 21 dímeros de kn individuales moviéndose de forma procesiva a lo largo de un único pf. La figura 4.12.a representa los perfiles axiales de todos los dímeros de kn observados en imágenes consecutivas con respecto a la primera imagen. Los desplazamientos se ajustan a una rejilla o retícula de 8 nm, lo cual es consistente con la periodicidad de los dímeros de tubulina [Nogales 1998] y con los valores establecidos para el tamaño de los pasos de la kinesina [Svoboda 1993].

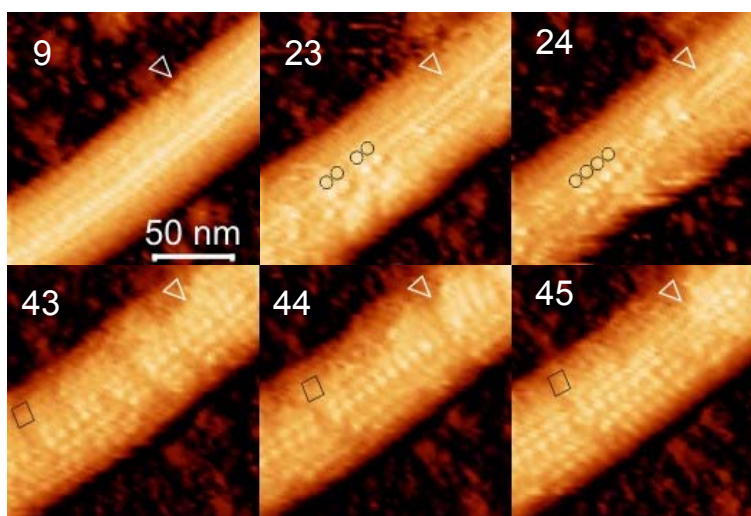


**Figura 4.12.** Curvas de perfiles alineadas sobre dímeros de kn en movimiento (paralelas al eje longitudinal del pf) mostrando una periodicidad axial de 8 nm. (a) Desplazamientos para 21 motores aislados moviéndose en diferentes muestras. Cada curva representa un perfil realizado a lo largo de un pf con el motor unido. El eje x muestra el desplazamiento axial de un motor con respecto a la primera imagen o a la imagen previa. La gran mayoría de los desplazamientos fueron observados más de una vez, en cuyo caso las curvas fueron promediadas. Las curvas son representadas con un desplazamiento en el eje y para más claridad. (b) Promedio de todos los perfiles después de restar el respectivo múltiplo de 8 nm. Se resuelve claramente la separación de 8 nm entre las dos cabezas.

El promedio de todos los perfiles nos indica que los motores son capturados en posiciones en las que ambas cabezas se encuentran separadas entre sí una distancia de 8 nm (Fig. 4.12.b). La longitud máxima para el recorrido de un motor observada en nuestras imágenes es de 100 nm ya que esta longitud se encuentra limitada por el tamaño del área de barrido y por la velocidad de barrido, y no por la autonomía de movimiento del motor. A partir de las imágenes de AFM hemos podido resolver que los desplazamientos de los motores son múltiplos de 8 nm pero la velocidad de barrido no nos ha permitido capturar pasos individuales de los motores durante su movimiento. Para conseguir resultados más óptimos, la velocidad de barrido debería ser ligeramente superior a la velocidad de los pasos de kn.

#### 4.5.2. Movilidad en condiciones de saturación

En el interior de la célula, la kinesina se encuentra en presencia de otras proteínas y motores que también se unen al MT, por lo que *in vivo* la kn realmente trabaja en un ambiente de saturación o aglomeración. Podemos plantearnos varias cuestiones de relevancia fisiológica en tales condiciones: ¿Qué sucede cuando un motor se encuentra un obstáculo en su camino? ¿Lo salva de alguna manera o se detiene frente a él? ¿Cómo se mueven los motores de forma colectiva en este límite de alto grado de ocupación? Para imitar el ambiente de aglomeración en el recorrido de los motores *in vitro*, añadimos a los MTs adsorbidos en superficie una concentración relativamente grande de kinesina ( $\sim 2$  motores/1 dímero de tubulina) y  $0.5 \mu\text{M}$  de ATP. Inmediatamente después, empezamos a registrar imágenes sucesivas de la misma zona del MT en una película para observar cómo los motores llegan al MT y hacia donde se dirigen. En la figura 4.13 se muestran algunos de los datos más representativos de esta película compuesta por un total de 60 imágenes.



**Figura 4.13.** Recubriendo un MT con motores en presencia de  $0.5 \mu\text{M}$  de ATP. Se muestran 6 imágenes seleccionadas de una película compuesta de 60 fotogramas. La película se registró directamente después de añadir los motores con ATP en el *buffer* fisiológico. Imagen 9, el MT sin recubrir muestra un defecto visible como una interrupción en la superficie del MT (indicado por un triángulo blanco). En las imágenes siguientes (no incluidas) los motores aparecen y desaparecen, ya que su velocidad es demasiado alta para capturarlos en imágenes consecutivas. Imágenes 23, 24, observamos dos motores individuales (posicionados paralelamente a los círculos dibujados), donde el último realiza un paso hacia la parte inferior de la imagen. Imágenes 43-44, muestran la movilidad de los defectos en el recubrimiento del MT (indicados por cuadrados al lado). Imagen 45, el MT se encuentra ya completamente recubierto. El tamaño y número de píxeles en las imágenes es de  $156 \times 156 \text{ nm}$  y  $64 \times 64$  píxeles respectivamente.

#### 4. Motores moleculares: la kinesina

---

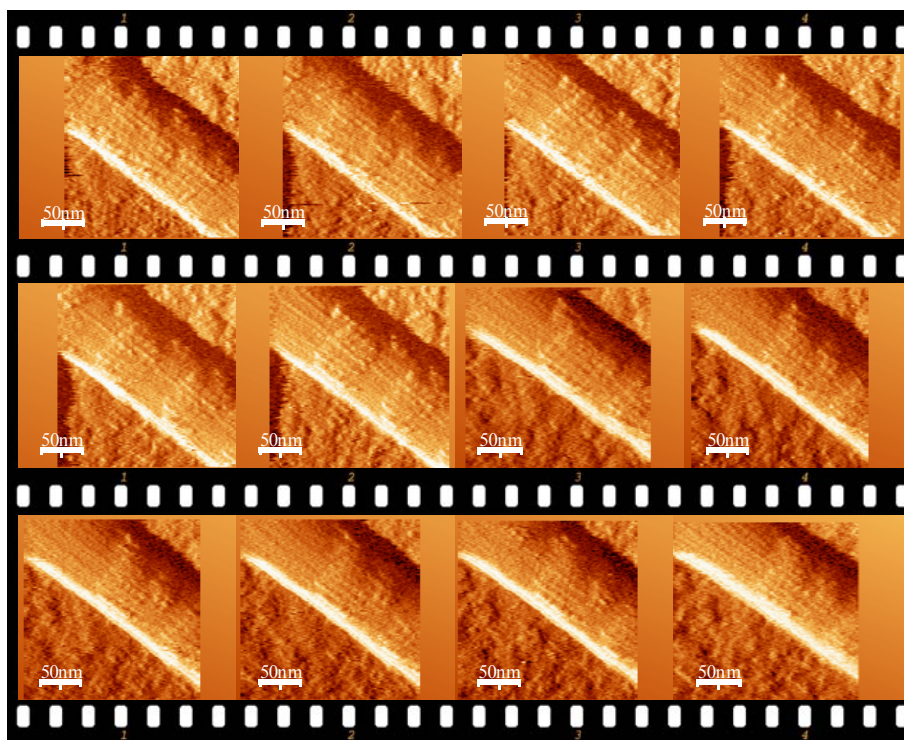
El tiempo de adquisición por imagen es de 10.6 s. Desde la inserción de los motores transcurren aproximadamente 2 minutos hasta que los primeros motores empiezan a aterrizar sobre el MT, pero sólo son visibles en la primera imagen, ya que cuando llegan se desplazan inmediatamente hacia la parte inferior de la imagen y desaparecen. Cuando aterrizan más motores, la velocidad de éstos se va ralentizando debido a un fenómeno de embotellamiento (imagen 23, 24). A medida que aparecen más motores, el MT consigue un mayor grado de recubrimiento e incluso se observan de nuevo defectos en la red de recubrimiento. La diferencia es que ahora estos defectos son móviles, es decir, cambian de posición entre imágenes consecutivas (imágenes 43-44). Finalmente, el MT se recubre por completo (imagen 45). Este “aterrizaje” aleatorio de los motores sobre el MT hace que la movilidad retenida permita a los motores empaquetarse densamente resultando en un número reducido de defectos en el recubrimiento del MT en comparación con el número de defectos cuando no hay movilidad. De los 342 dímeros de tubulina observados, sólo encontramos 21 defectos, es decir, un 6.1 %.

Además de los defectos en el recubrimiento del MT, también se encuentran defectos en la propia red del MT (Fig. 4.13, la posición de estos defectos está indicada con un triángulo blanco). Cuando los motores se encuentran en su camino este tipo de defectos, observamos que tienden a pararse y permanecer a su lado. La tendencia de la kn a seguir en un único pf y su falta de capacidad para rodear a los obstáculos pueden explicar parcialmente por qué se queda atrapada fácilmente cuando hay tráfico o defectos. Un mecanismo para evitar la acumulación de motores en el MT sería la desunión de sus cabezas, provocada por algún obstáculo en el camino. Se ha especulado sobre el ritmo de desunión con el MT cuando una de las cabezas se encuentra con un obstáculo a la hora de realizar su paso hacia delante [Rosenfeld 2003], lo cual podría facilitar que esquivase el obstáculo realizando pasos laterales. Recientemente, se ha medido el ritmo de desunión de la kinesina-1 de rata cuando en su camino hay monómeros de kn mutados, los cuales sirven como obstáculos [Crevel 2004]. Este trabajo ha mostrado que la kn se suelta rápidamente del MT cuando encuentra un obstáculo en el camino. Otros trabajos recientes [Seitz 2006], realizados con la kinesina-1 drosophila y a alta concentración de ATP, muestran lo opuesto y confirman nuestros resultados (obtenidos con la kinesina-1 de hongos), es decir, que la



kn prefiere esperar antes que soltarse cuando encuentra un obstáculo en su camino. Se requieren más experimentos para esclarecer si esta contradicción depende de las condiciones experimentales o quizás los miembros de la familia de kinesina-1 presentan comportamientos diferentes en estas situaciones [Kallipolitou 2001].

Para disminuir el grado de aglomeración de motores en las películas preparamos una muestra similar a la anterior pero con una concentración más baja ( $\sim 1$  motores/dímero de tubulina). Incubamos la muestra durante 20 minutos en presencia de  $5 \mu\text{M}$  de AMP-PNP. Después de este tiempo, la muestra es lavada repetidas veces para eliminar la mayor parte de AMP-PNP y finalmente añadimos  $0.5 \mu\text{M}$  de ATP. La figura 4.14 muestra las imágenes más representativas de una película compuesta en total por 29 fotogramas.



**Figura 4.14.** Movilidad de motores colectivos. Los motores se mueven claramente hacia la parte inferior de la imagen y las interrupciones en la movilidad son causadas por restos de AMP-PNP, retención en el movimiento o combinación de ambos. El tamaño y número de píxeles en las imágenes es de  $156 \times 156 \text{ nm}$  y  $128 \times 128$  píxeles respectivamente.

El tiempo de adquisición de cada imagen es de 38 s. Observamos que los motores se mueven hacia la parte inferior de la imagen y que las interrupciones en la

#### 4. Motores moleculares: la kinesina

---

movilidad son probablemente causadas por restos remanentes de AMP-PNP en la disolución, retención en el movimiento de los motores o una combinación de ambos efectos.

Durante el tiempo comprendido entre 10 y 30 segundos que tarda en adquirirse una imagen, el motor puede realizar un movimiento de entre 10 y 100 nm, por lo que normalmente las cabezas se observan como máximo dos veces antes de desaparecer. Para poder seguir los pasos de motores individuales en estas condiciones de aglomeración o saturación, es necesario tener una mayor resolución temporal y marcar una de las cabezas del dímero para poder identificar los motores individuales. De esta forma podríamos estudiar la movilidad colectiva de los motores bajo condiciones de aglomeración.

La congestión en el rápido transporte axonal se ha inducido por acumulación de orgánulos mediante mutaciones de la kinesina [Hurd 1996]. También muchas enfermedades degenerativas se han relacionado con la influencia de otras proteínas en la actividad de la kinesina [Gunawardena 2004], donde un posible mecanismo para la aparición de estas enfermedades podría ser la inducción de bloqueos por las propias proteínas. Para el transporte intracelular esto significaría que los MTs tienen que estar relativamente limpios para garantizar que los motores tengan un camino libre de obstáculos. La posible competición de motores u otros MAPs en el interior de la célula podrían actuar como obstáculos causando congestión. Probablemente el desarrollo de un AFM más rápido pueda proporcionar la visualización del comportamiento dinámico de proteínas bajo condiciones de aglomeración a una resolución de proteínas individuales.

#### 4.6. RESUMEN

La kinesina es un motor proteico dimérico que interacciona con los microtúbulos del citoesqueleto de las células eucarióticas. El número de familias y miembros de kinesinas es muy diverso, así como las funciones que desempeñan. Nosotros hemos estudiado un miembro de la familia de la kinesina-1: la Nckin433 truncada, la cual forma motores diméricos altamente procesivos y se encarga del transporte de cargas a lo largo de los MTs. Para llevar a cabo este movimiento, la kinesina consume una molécula de ATP en cada paso de longitud 8 nm. Hemos

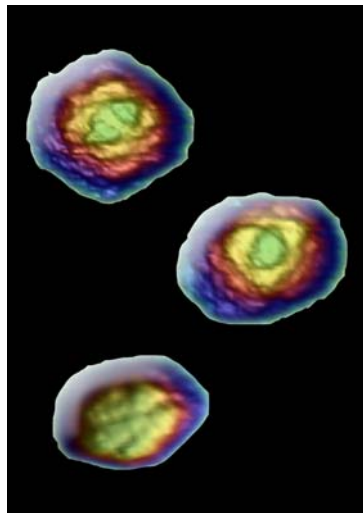


caracterizado la interacción entre los MTs y la kinesina en los estados de AMP-PNP y de ATP. En el estado de AMP-PNP hemos obtenido imágenes de los MTs con diferentes grados de recubrimiento del motor molecular, variando el grado de decoración o recubrimiento en función de la concentración de motores diméricos utilizada. Así, hemos conseguido MTs completamente recubiertos o con motores individuales aislados. Las estadísticas del grado de recubrimiento y el número de defectos encontrados indican que el motor se une al MT de una forma no cooperativa. La aplicación del AM-DAFM en líquidos ha permitido distinguir las cabezas individuales del motor unidas al MT en condiciones fisiológicas con una alta resolución, encontrando que en el estado AMP-PNP, ambas cabezas permanecen unidas a lo largo de un único protofilamento. De igual forma, en el estado ATP, durante el movimiento sobre los MTs, los motores están predominantemente unidos con ambas cabezas a un único protofilamento. Este hecho proporciona una fuerte evidencia de que la kinesina está la mayor parte de su ciclo mecánico-químico con ambas cabezas unidas firmemente al MT, por lo que puede resistir las fuerzas ejercidas por la punta del AFM. Esto es consistente con los resultados de microscopía de fluorescencia [Yildiz 2004]. Utilizando una baja concentración de ATP pudimos seguir el movimiento de motores individuales, los cuales alcanzan velocidades entre 2 y 5 nm/s. En el recorrido de los motores individuales, visualizamos que las cabezas de un dímero caminan siempre por el mismo protofilamento realizando pasos de 8 nm. Por otra parte, también hemos observado cómo se comportan los motores en condiciones de saturación o aglomeración. En este caso, su velocidad disminuye y si se encuentran con un obstáculo en su camino se detienen.



## **CAPÍTULO 5:**

### **PROPIEDADES MECÁNICAS DE CÁPSIDAS VÍRICAS.**



*“El hombre aún lleva impresa en su estructura corpórea la huella indeleble de su humilde origen...”*, Charles Darwin: El origen de las especies.



## 5. PROPIEDADES MECÁNICAS DE CÁPSIDAS VÍRICAS

Los virus (del latín *virus*, veneno) son entidades biológicas que se localizan en la frontera entre la materia inanimada y la materia viva. Estos parásitos carecen de vida independiente y sólo son activos cuando infectan células. Los virus son la causa de una gran cantidad de enfermedades, incluidos algunos tipos de cáncer, que afectan a los seres humanos, animales, bacterias y plantas. El complejo ciclo biológico de los virus, casi automático, hace que estas nanomáquinas de apariencia sencilla sean la admiración de los equipos de investigación especializados en nanotecnología. El estudio de la estructura y funcionamiento de los virus es fundamental para sus aplicaciones médicas. Sin embargo, su posible utilidad para otros fines es una perspectiva que se está contemplando actualmente. En los últimos años se ha considerado la posibilidad de manipular estas nanomáquinas con fines terapéuticos para el ser humano. Por ejemplo, es posible utilizar su capacidad de translocación del material genético en células sanas, para poder introducir moléculas específicas en células cancerígenas, usándolos así como dispensadores locales de fármacos. La capacidad que posee un virus para realizar esta tarea depende de varios factores, entre ellos las propiedades elásticas de la cápsida, la manera en la que el material genético se empaqueta en su interior y/o la interacción entre la cápsida y el material genético.

Nosotros nos hemos centrado en el estudio de las propiedades mecánicas de virus individuales, analizadas con el AFM en condiciones fisiológicas, con dos objetivos principales: por un lado, estudiar la posible variación del comportamiento mecánico del virus cuando éste pasa de estar vacío a estar lleno de material genético y por otro lado, estudiar la influencia de la manipulación genética del virus en las modificaciones de sus propiedades mecánicas.

Para llevar a cabo tales tareas, así como los experimentos realizados en el capítulo siguiente, iniciamos una colaboración con el grupo del Prof. José L.

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

Carrascosa, del Departamento de Estructuras de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y con el grupo del Dr. Mauricio G. Mateu, del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO) perteneciente al CSIC y a la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

### 5.1. FUNCIONES Y ESTRUCTURA DE CÁPSIDAS VÍRICAS

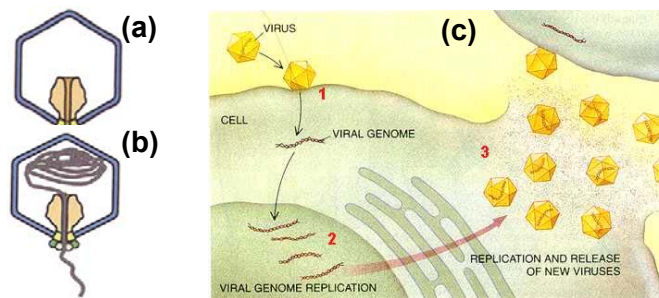
Un virus es un microorganismo infeccioso intracelular que carece de la capacidad de crecer o reproducirse fuera de la célula huésped. Cada partícula posee solamente un tipo de ácido nucleico, ADN o ARN, el cual está protegido por una capa proteínica que se llama cápsida (Fig. 5.1.a). En general, el ácido nucleico es una molécula única de hélice simple o doble aunque algunos virus lo tienen segmentado en dos o más partes. La cápsida está compuesta por numerosas unidades proteicas que se autoensamblan uniéndose entre sí por interacciones químicas determinando la morfología de la cápsida. La estructura de la cápsida debe ser suficientemente eficiente para mantener en su interior al ácido nucleico. Al estado de maduración de la cápsida, es decir, cuando el material genético se encuentra en su interior se le denomina virión (Fig. 5.1.b). El tamaño de un virus puede variar entre 20 y 300 nm. En algunos tipos de virus, el paso a la maduración va acompañado también de cambios estructurales en la cápsida, pudiendo aumentar su tamaño y disminuir el espesor de la pared.

#### 5.1.1. Ciclo biológico de un virus

Los virus se replican en el interior de las células parasitando el metabolismo activo de éstas. De forma muy general el ciclo biológico de un virus (Fig.5.1.c) se puede resumir en tres fases: (1) *Fase de iniciación*, que consiste en la unión del virión a una zona receptora específica de la superficie celular, lo que permite la entrada del virión a la célula quedando el genoma viral al descubierto. (2) *Fase de replicación*, donde se inicia la síntesis de los componentes vitales (ácido nucleico y proteínas). (3) *Fase de liberación*, los genomas virales recién sintetizados y los polipéptidos de la cápsida se ensamblan para formar los nuevos virus infecciosos o viriones, los cuales pueden provocar la lisis celular. En este momento, los viriones están preparados para infectar a nuevas células sanas, repitiéndose el ciclo viral. La forma en la que se desarrollan estas fases así como las zonas específicas donde ocurren estos procesos en

el interior de la célula varía de un grupo a otro de virus. Por ejemplo, hay grandes diferencias entre un virus animal y un bacteriófago (virus que infecta bacterias).

Por tanto, los viriones no son sólo cápsidas inertes encargadas de proteger al material genético sino que se tratan de auténticas nanomáquinas que transportan el material genético a zonas muy precisas en el interior de células.



**Figura 5.1.** (a) Corte transversal de una cápsica icosaédrica vacía y (b) llena de material genético, formando el virión. (c) Esquema general del ciclo infeccioso de un virus icosaédrico: (1) fase de iniciación, (2) fase de replicación, (3) fase de liberación.

Podemos distinguir distintos tipos de morfologías de las cápsidas:

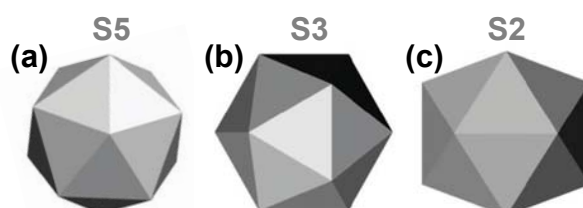
- Helicoidales: con forma de filamento, los cuales pueden ser cortos y rígidos o largos y flexibles. La longitud de la cápsida helicoidal está relacionada con la longitud del ácido nucleico contenido en su interior. El virus del mosaico del tabaco es un ejemplo de virus helicoidal.
- Icosaédricas: con una apariencia aproximadamente esférica. Como ejemplo podemos citar el virus de la hepatitis B.
- Complejas: poseen una envoltura exterior que contiene lípidos y azúcares ligados a las proteínas de la cápsida y pueden ser icosaédricas (virus del herpes), helicoidales u otras formas más complejas. Algunos bacteriófagos tienen una estructura compleja que consiste en una cabeza icosaédrica unida a una cola tubular con largas patas o fibras para unirse a la bacteria huésped.

### 5.1.2. Arquitectura de las cápsidas

La gran mayoría de las cápsidas conocidas en la naturaleza presentan una estructura icosaédrica debido a que, en principio, un icosaedro es la estructura que tiene mayor relación superficie/volumen y por tanto, mayor estabilidad. Un icosaedro tiene tres clases de ejes de simetría rotacional (Fig. 5.2): ejes de orden 5, ejes de orden 3 y ejes de orden 2. Los ejes de orden 5 conectan el centro de la cápsida con cada uno de

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

los 12 vértices del icosaedro; los ejes de orden 3 conectan el centro de la cápsida con el centro de cada triángulo equilátero de las 20 caras del icosaedro; los ejes de orden 2 conectan el centro de la cápsida con el centro de las 30 aristas del icosaedro. Por lo que, un icosaedro es un cuerpo geométrico con una simetría rotacional 5:3:2 donde se debe cumplir que caras + vértices = aristas + 2.



**Figura 5.2.** Ejes de simetría rotacional de un icosaedro: (a) eje de orden 5, (b) eje de orden 3, (c) eje de orden 2.

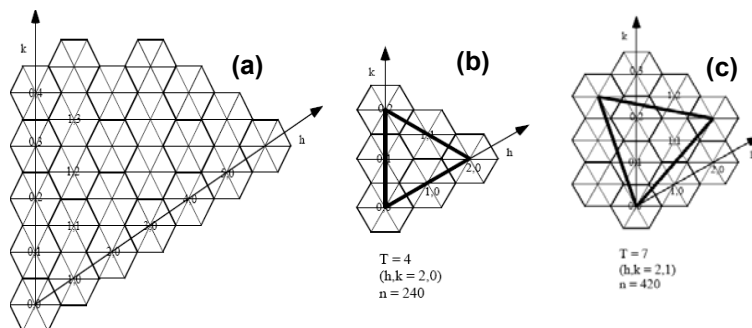
Una cápsida icosaédrica es una estructura isométrica con 12 vértices pentagonales por lo que, en principio, sólo podrá estar formada por 60 unidades equivalentes. A cada una de las unidades proteicas equivalentes se las denomina protómeros. Crick y Watson iniciaron en 1956 la teoría sobre la construcción de la estructura icosaédrica de los virus [Crick 1956], basada principalmente en consideraciones teóricas puesto que carecían de fuertes evidencias experimentales contrastadas. Esencialmente, consistía en que la construcción de la cápsida debería realizarse utilizando el mismo tipo de unidades una y otra vez, interaccionando entre sí para construir la estructura icosaédrica. A esta teoría se la conoce como teoría de las subunidades idénticas. A medida que se fueron descubriendo nuevos virus, se observó que eran necesarias más de 60 unidades estructurales (proteínas) idénticas para generar algunos de los tamaños encontrados. Por lo que se plantearon una serie de preguntas: ¿cómo se puede formar una cápsida icosaédrica con más de 60 unidades? ¿Es válido cualquier número de unidades para formarla? ¿Cómo se organizan estas unidades?

La teoría de la cuasiequivalencia [Caspar 1962], expuesta por Caspar y Klug en 1962, responde a estas preguntas. Esta teoría indica que aunque el icosaedro es una estructura estable, no todas las interacciones son idénticas, es decir, hay que considerar una cierta flexibilidad en los contactos entre unidades.

A partir de una malla hexagonal plana como la mostrada en la figura 5.3.a es posible construir cualquier estructura icosaédrica. Para curvar la red hexagonal y



generar una estructura cerrada algunos hexágonos deben convertirse en pentágonos, que son los que introducen la curvatura en la red original. Si definimos un sistema de coordenadas con los vectores  $k$  y  $h$ , se puede demostrar geoméricamente que  $T = k^2 + h^2 + kh$ , donde  $k$  y  $h$  son números enteros y definen la posición de los pentágonos en la red hexagonal original y  $T$  es el número de triangulación que puede tomar los valores 1, 3, 4, 7, 9, etc. El número de triangulación  $T$  nos da una relación entre una estructura determinada y el icosaedro básico. De hecho, nos dice el número de triángulos pequeños o trímeros en los que la cara fundamental del icosaedro está dividida. En esta estructura más compleja, las unidades proteicas podrán situarse en los 12 vértices principales del icosaedro formando pentámeros o en los nuevos vértices originados por esta subdivisión formando hexámeros. A las agrupaciones de protómeros para formar pentámeros o hexámeros se les denomina capsómeros. Por lo que, no todos los capsómeros son iguales y si coexisten ambos tipos las interacciones entre ellos son diferentes. Así, el número de triangulación no solo describe la geometría del virus sino también el número de entornos cuasiequivalentes o conformaciones distintas (confórmeros) de las unidades proteicas, aumentando el número de confórmeros con el de triangulación.



**Figura 5.3.** (a) Malla plana hexagonal a partir de la cual, definiendo los vectores  $k$  y  $h$ , se genera una estructura icosaédrica. (b) Cara fundamental de una cápsida simétrica con  $T = 4$  ( $h, k = 2, 0$ ) y número total de subunidades  $60 \times T = 240$ . (c) Cara fundamental de una cápsida asimétrica con  $T = 7$  ( $h, k = 2, 1$ ) y número total de subunidades  $60 \times T = 420$ .

Por ejemplo, si  $k = 1$  y  $h = 0$  tendremos el caso más simple de cápsida icosaédrica donde  $T = 1$  y todas las unidades son equivalentes, es decir, todos los enlaces son idénticos. En todos los casos en los que  $k$  o  $h$  adquieren el valor cero o en los que  $k = h$ , la cápsida es simétrica con respecto a las coordenadas (Fig. 5.3.b). En

cambio, si  $k$  y  $h$  son distintos, la cápsida es asimétrica estando la cara fundamental girada (Fig. 5.3.c).

Independientemente del valor de  $T$ , cualquier cápsida icosaédrica que cumpla el principio de cuasiequivalencia siempre va a tener 12 pentámeros,  $10 \times (T-1)$  hexámeros y  $10 \times T + 2$  vértices. El número de subunidades total es  $60 \times T$  (pentámeros  $\times 5$  + hexámeros  $\times 6$ ) y el número de trímeros y dímeros totales son  $20 \times T$  y  $30 \times T$  respectivamente. Por ejemplo, un virus con  $T = 4$ , tiene 4 conformaciones distintas y  $60 \times T = 240$  subunidades. La correspondencia entre el número  $T$  y el número de conformaciones no siempre se mantiene. Hay casos de virus constituidos por distintas proteínas que se sitúan en posiciones cuasiequivalentes. En estos casos se trabaja con pseudonúmeros de triangulación  $P$  [Liddington 1991]. Estudios de microscopía electrónica y difracción de rayos-X han confirmado que en la construcción de la gran mayoría de los virus esféricos se aplica la regla del número de triangulación  $T$  [Baker 1999]. La tendencia de las cápsidas a autoensamblarse escogiendo estos números especiales de triangulación se debe a que estas estructuras presentan un mínimo de energía libre [Zandi 2004]. La estructura geométrica de los fullerenos y los nanotubos de carbono es similar a la de los virus. Por ejemplo, la molécula de  $C_{60}$  tiene la misma estructura que una cápsida con número de triangulación  $T = 3$ .

### 5.1.3. Interacción entre capsómeros

A pesar de la variedad en tamaño, secuencia de aminoácidos y conformación de las proteínas de las cápsidas, la mayoría de los virus esféricos se autoensamblan originando cápsidas con una simetría icosaédrica. Hemos visto que las proteínas de las cápsidas se pueden organizar en pentámeros (agregados de cinco proteínas) o en hexámeros (agregados de seis proteínas). Según la teoría de elasticidad continua, debido a la curvatura que sufre la red hexagonal plana original (Fig. 5.3.a) para formar estructuras cerradas, las cápsidas van a estar caracterizadas por la presencia de dos energías elásticas: energía de estiramiento (*stretching*) en los pentámeros localizados en los 12 vértices del icosaedro y energía de curvatura (*bending*) a lo largo de las aristas que conectan a los pentámeros. Ambas energías elásticas están relacionadas por el número adimensional de Foppl-von Karman (FvK)  $\gamma = ER^2/\kappa$ , donde  $R$  es el radio,  $E$  es el módulo de Young y  $\kappa$  es la rigidez flexional para la cápsida esférica [Lidmar

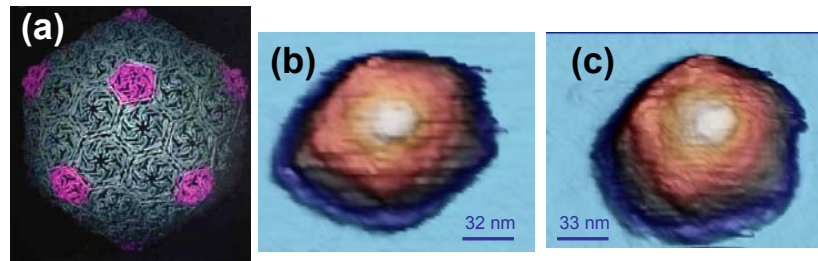
2003]. El fallo estructural de las cápsidas víricas sometidas a tensión mecánica está relacionado con el número de FvK [Klug 2006].

Realizar un modelo que describa las interacciones entre cada una de las proteínas que forman la cápsida puede ser complicado ya que estas interacciones son asimétricas y específicas para cada sitio [Reddy 1998]. En cambio, la interacción entre los capsómeros es más genérica y puede ser modelada mediante potenciales de interacción tipo Lennard-Jones [Zandi 2004]. Simulaciones usando este tipo de potenciales de interacción entre capsómeros han revelado la existencia de una distribución heterogénea de estrés residual para cápsidas con  $T > 1$ , aún en la configuración óptima que minimiza la energía total del sistema [Zandi 2005]. La distribución del estrés residual depende de la geometría y del carácter discreto del sistema. Este estrés residual también ha sido detectado para otro tipo de estructuras geoméricamente similares a los virus, como son los fullerenos y los nanotubos de carbono [Robertson 1992; Chandra 2004], donde la teoría de elasticidad continua no tiene porqué ser aplicada para describir el comportamiento de estas estructuras. En concreto, los pentámeros poseen un estrés residual superior al de los hexámeros, el cual disminuye con el tamaño de la cápsida. En los experimentos de nanoindentación con el AFM podría ser posible encontrar un comportamiento mecánico diferente en los pentámeros con respecto a los hexámeros. De hecho, cuando la punta del AFM indenta a un objeto esférico cuya deformación es controlada por la tensión superficial, la constante elástica es aproximadamente igual a la tensión superficial [Attard 2001].

Para una cápsida icosaédrica con  $T = 7$ , es decir, compuesta por 72 capsómeros y 420 proteínas, se ha observado que hay sólo dos niveles de tensión, uno corresponde a los 12 pentámeros y otro a los 60 hexámeros [Zandi 2005]. Vamos a utilizar cápsidas del bacteriófago T7 vacías, es decir sin material genético, para visualizar los capsómeros con AFM en medio líquido. El fago T7 en su estado maduro contiene una molécula lineal de ADN de cadena doble e infecta a la bacteria *Escherichia coli*. Las procápsidas de T7 se expanden mediante el proceso de empaquetamiento del material genético, lo que induce el proceso de maduración de la cápsida provocando un aumento del diámetro de la misma, una disminución del espesor de la pared y un aspecto más poliédrico [Cerritelli 2003]. En nuestro caso, el material genético fue extraído mediante un proceso bioquímico del interior de la cápsida. Las cápsidas icosaédricas del fago T7

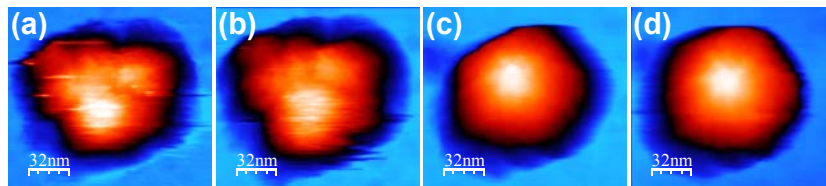
## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

tienen un número de triangulación  $T=7$  (Fig. 5.4.a), donde todos los pentámeros localizados en los 12 vértices se encuentran rodeados de hexámeros. Las figuras 5.4.b y 5.4.c muestran imágenes de AFM del fago T7 en medio líquido. Las partículas están orientadas a lo largo del eje de simetría 5, es decir apoyadas sobre uno de los 12 vértices, pudiéndose resolver claramente unos de los pentámeros en el centro de las cápsidas.



**Figura 5.4.** Bacteriófago T7 orientado en un eje de simetría 5. (a) Organización de una cápsida con  $T=7$  (fago HK97, perteneciente a Johson J. E) que muestra las posiciones de los pentámeros (magenta) y los hexámeros (verde). (b, c) Imágenes de AFM, donde las cápsidas muestran una clara forma pentagonal. Se resuelve una pequeña estructura en el centro de las mismas, que corresponde a uno de los pentámeros localizado en un vértice.

Hemos utilizado el modo dinámico AM-DAFM en líquidos con la micropalanca BL-RC150VB, para estudiar la diferencia en el comportamiento mecánico entre el pentámero y el resto de la cápsida cuando aplicamos fuerzas radiales sobre estas partículas. En la figura 5.5 se muestra una secuencia de imágenes donde se han aplicado distintas fuerzas sobre la cápsida mediante el control del valor de la reducción de amplitud usada como señal de realimentación. Empezamos aplicando una fuerza de  $\sim 430$  pN (Fig. 5.5.a) y terminamos con una fuerza de  $\sim 150$  pN (Fig. 5.5.d).

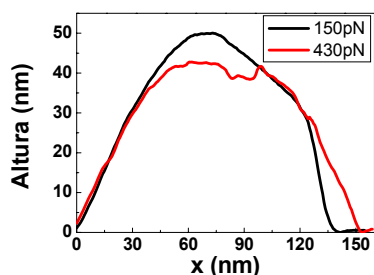


**Figura 5.5.** Cambios estructurales en la cápsida del fago T7 provocados por una serie secuencial de fuerzas aplicadas en el modo AM-DAFM: (a) 430 pN, (b) 360 pN, (c) 200 pN, (d) 150 pN. El decremento de la fuerza aplicada provoca un aumento de altura de la cápsida y la visualización del pentámero central. Nótese que este proceso es reversible.

Si comparamos la imagen (a) y la imagen (d) observamos que el aumento de fuerza aplicada provoca una disminución de la altura de toda la cápsida y una depresión

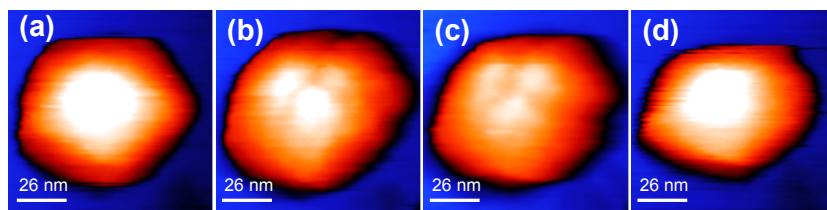
algo más marcada del pentámero central resuelto en la imagen (d). El pentámero central se hunde  $\sim 13$  nm, mientras que el resto de cápsida, es decir, los demás capsómeros son comprimidos  $\sim 9$  nm (Fig. 5.6).

La energía necesaria para realizar el hundimiento del pentámero y del resto de los capsómeros es del orden de  $1300 k_B T$  y  $1000 k_B T$  respectivamente. Una peculiaridad a destacar es la reversibilidad del proceso observado.



**Figura 5.6.** Perfiles topográficos de dos imágenes de la figura 5.5. Cuando la fuerza aplicada es  $\sim 150$  pN, la altura de la cápsida es  $\sim 52$  nm (imagen (d), línea negra). Cuando la fuerza se incrementa a  $\sim 430$  pN, se provoca una disminución de la cápsida y del pentámero central de  $\sim 9$  nm y  $\sim 13$  nm relativa a la altura nominal respectivamente (imagen (a), línea roja).

Comprobamos la reproducibilidad de la flexibilidad de los capsómeros encontrada anteriormente. En la figura 5.7 se muestran los datos más representativos correspondientes a una secuencia compuesta por 8 imágenes.



**Figura 5.7.** Cambios estructurales en la cápsida del fago T7 provocados por una serie secuencial de fuerzas aplicadas en el modo AM-DAFM: (a) 210 pN, (b) 300 pN, (c) 398 pN, (d) 140 pN. El incremento de la fuerza aplicada provoca la depresión del pentámero central y es reversible cuando volvemos a aplicar la fuerza inicial.

Empezamos aplicando una fuerza de  $\sim 210$  pN (Fig. 5.7.a), la cual va aumentando progresivamente hasta  $\sim 398$  pN (Fig. 5.7.c). Posteriormente, aplicamos una fuerza de  $\sim 140$  pN (Fig. 5.7.d) y comprobamos que el proceso es reversible. En este caso, hemos conseguido una depresión del pentámero central de  $\sim 8$  nm y una compresión del resto de la cápsida de  $\sim 6$  nm. Esto implica una energía para el hundimiento del pentámero y del resto de la cápsida de  $\sim 750 k_B T$  y  $\sim 560 k_B T$  respectivamente.

En los dos experimentos presentados, observamos cambios estructurales en las cápsidas provocados por las fuerzas aplicadas en la dirección radial. Estos cambios son

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

reversibles para el rango de fuerzas empleadas, induciendo a una deformación reversible mayor en los pentámeros que en el resto de los capsómeros, es decir, los pentámeros son más elásticos. Por lo que es lógico pensar que el proceso de desensamblaje de la cápsida pueda ser iniciado en los pentámeros. Este hecho ha sido observado experimentalmente para el fago P22 cuando se producen cambios en las condiciones ambientales [Teschke 2003]. Es difícil valorar los resultados cuantitativos obtenidos ya que debemos tener en cuenta dos aspectos importantes: por un lado, la cápsida del bacteriófago T7 estudiada aquí se encuentra expandida, por lo que su pared está sometida a una tensión extra, por lo que el estrés residual es muy distinto al de la cápsida sin expandir [Zandi 2005] y por otro lado, debido al tamaño típico de la punta del AFM es imposible realizar una indentación exclusivamente sobre un pentámero o un hexámero, por lo que en los valores obtenidos también están involucrados algunos de los capsómeros vecinos. Sólo usando puntas muy finas, por ejemplo fabricadas con nanotubos de carbono, podría ser posible presionar de forma selectiva sobre un pentámero. A pesar de esto, el comportamiento cualitativo observado es válido y consistente con los cálculos teóricos [Zandi 2005].

### 5.2. CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS

En 1892 Ivanovski descubrió unas partículas microscópicas, conocidas más tarde como el virus del mosaico del tabaco (TMV) [Ivanovski 1982]. En 1936 Stanley cristalizó el TMV demostrando que estaba compuesto de material genético (ARN) y de una envoltura proteica [Stanley 1936]. La visualización de los virus fue posible por primera vez en la década de los años 40 gracias al desarrollo del microscopio electrónico. El estudio de los virus animales alcanzó su culminación en la década de 1950, con el desarrollo de los métodos de cultivo de células. Desde entonces se han descubierto numerosos virus que han sido analizados para determinar sus propiedades físicas y químicas. Actualmente, el número de familias de virus conocidos es superior a 90 [van Regenmortel 2000], mientras que hay más de 1.500 de especies caracterizadas. Pueden ser agrupados en virus animal, virus de plantas y bacteriófagos, dependiendo del tipo de organismo al que infectan. Su clasificación está basada en las características morfológicas, tipo de ácido nucleico, modo de replicación, organismos al que se infecta y tipo de enfermedad que producen.

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) ha propuesto la siguiente jerarquía taxonómica, donde el sufijo denota el rango taxonómico:

Orden → *-virales*

Familia → *-viridae*

Subfamilia → *-virinae*

Género → *-virus*

Especie → *-virus*

David Baltimore, premio Nobel de biología en 1975, diseñó el denominado Sistema de Clasificación de Baltimore [Baltimore 1971], en el cual clasifica a los virus en siete grandes grupos, basándose en su modo de replicación y tipo de ácido nucleico. Dentro de cada uno de estos grupos se incluyen algunas de las distintas familias que los componen:

- Clase I, virus con ADN de cadena doble: *Herpesviridae* (virus del herpes humano, virus zoster de la varicela), *Adenoviridae*, *Poxviridae*, *Papillomaviridae* (virus del papiloma humano), *Myoviridae*, *Podoviridae* (bacteriófagos  $\Phi 29$  y T7).
- Clase II, virus con ADN de cadena simple: *Circoviridae*, *Parvoviridae*.
- Clase III, virus con ARN de cadena doble: *Reoviridae* (rotavirus), *Birnaviridae*.
- Clase IV, virus con ARN de cadena simple-polaridad positiva: *Astroviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae*, *Arteriviridae*, *Caliciviridae*, *Flaviviridae* (virus de la hepatitis C), *Togaviridae* (virus de la rubéola).
- Clase V, virus con ARN de cadena simple-polaridad negativa: *Arenaviridae*, *Orthomyxoviridae* (virus de la influenza), *Paramyxoviridae* (virus de la papera, virus del sarampión), *Bunyaviridae*, *Filoviridae*, *Rhabdoviridae* (virus de la rabia).
- Clase VI, virus con ARN de cadena simple-polaridad positiva que se replica a través de un ADN intermediario: *Retroviridae* (virus VIH).
- Clase VII, virus con ADN de cadena doble que se replica a través de un ssRNA intermediario: *Hepadnaviridae* (virus de la hepatitis B).

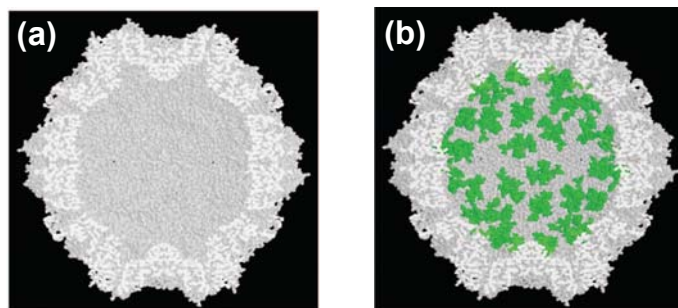
El Sistema de Clasificación de Baltimore es utilizado conjuntamente con la clasificación desarrollada por el ICTV.

### 5.3. EL VIRUS DIMINUTO DEL RATÓN (MVM)

El virus objeto de nuestro estudio pertenece a la clase II del Sistema de Clasificación de Baltimore, en concreto a la familia *parvoviridae* y dentro de ésta a la subfamilia *parvovirinae*. A esta subfamilia pertenecen tres géneros: parvovirus, eritrovirus y dependovirus. El prefijo “*parvo*” proviene del latín y significa pequeño, por lo que en la familia *parvoviridae* se encuentran algunos de los virus más pequeños y simples observados en la naturaleza. Fueron descubiertos durante los años 60 e infectan a vertebrados e insectos. El virus B19, perteneciente al género de los eritrovirus, fue el primer virus humano descubierto en la familia *parvoviridae* [Cossart 1975] y es asociado con la artritis. Al género de los parvovirus pertenecen entre otros el parvovirus canino, el parvovirus porcino y el virus diminuto del ratón, *Murine Minute Virus* (MVM), siendo éste último la especie más estudiada del género parvovirus.

El MVM es uno de los virus más pequeños y estructuralmente simples que se conocen hasta la fecha. Su cápsida está formada por 60 unidades proteicas estructuralmente equivalentes que se ensamblan para originar una simple cápsida sin envoltura de morfología icosaédrica con número de triangulación  $T = 1$  y diámetro de 25 nm [Tsao 1991; Agbandje-McKenna 1998]. Dentro de la cápsida se empaqueta el material genético, ADN lineal de cadena simple (ssDNA) con una longitud ~5kb. Tanto la estructura atómica de la cápsida vacía como la del virión lleno de ADN han sido determinadas por cristalografía de rayos-X, mostrando grandes similitudes estructurales entre ambas [Agbandje-McKenna 1998; Kontou 2005] (Fig. 5.8). Los datos cristalográficos también han revelado que aproximadamente el 30% del material genético permanece ordenado en el interior de la cápsida, por lo que ha sido visualizado como extensiones de oligonucleótidos conformacionalmente definidas, las cuales están unidas a 60 pequeñas concavidades localizadas en posiciones simétricamente equivalentes en la superficie interna de la cápsida [Agbandje-McKenna 1998] (Fig. 5.8.b). El 70% de ADN restante está desordenado en el interior del virus, por lo que no origina ningún patrón de difracción reconocible.





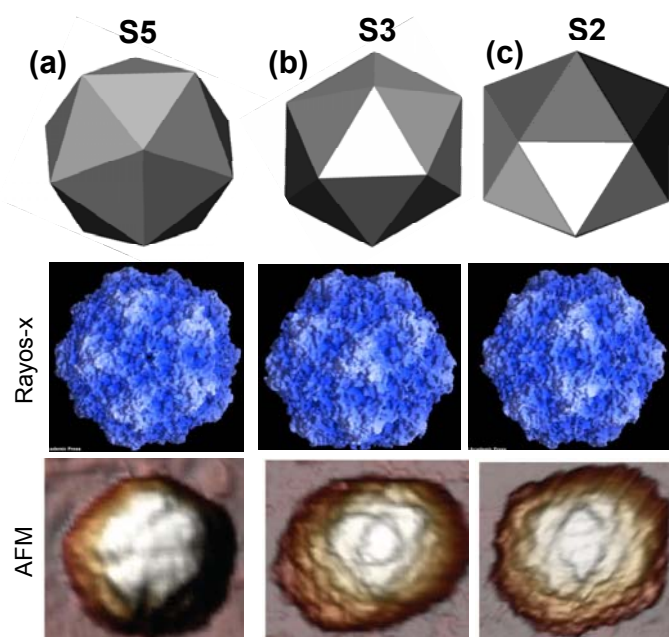
**Figura 5.8.** Corte transversal de las estructuras cristalográficas, representadas con modelos de van der Waals, de la cápsida vacía (a) y del virión lleno de ADN (b) mostrando el interior de la partícula. En el virion, las extensiones de ADN, cuya conformación está cristalográficamente resuelta, se observan en color verde unidas a 60 zonas o cavidades simétricas en la superficie interna de la cápsida.

#### 5.4. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL MVM POR AFM EN MEDIO LÍQUIDO

El MVM tiene un número de triangulación  $T = 1$ , por lo que su geometría es la de un simple icosaedro formado por 20 caras o triángulos equiláteros y 12 vértices (Fig. 5.9, primera fila). Los modelos atómicos de rayos-X muestran unas características topográficas locales bien definidas para cada una de las tres posibles orientaciones de la partícula icosaédrica del MVM (Fig. 5.9, segunda fila) [Agbandje-McKenna 1998]. Así, en el eje de simetría 5 (S5) observamos unas estrechas prominencias alrededor de un pequeño poro localizado en cada uno de los 12 vértices del icosaedro, en el eje de simetría 3 (S3) encontramos las espículas de 22 Å de longitud y 70 Å de diámetro formadas por residuos de cada una de las tres proteínas que forman este eje y en el eje de simetría 2 (S2) discernimos un hueco o depresión entre las espículas. Los ejes de simetría se suelen representar con un pentágono para el eje de S5, un triángulo para el eje de S3 y una elipse para el eje de S2. Las imágenes de AFM del MVM fueron obtenidas mediante JM en condiciones fisiológicas (Fig. 5.9, tercera fila), donde podemos observar las mismas características topográficas descritas en los modelos atómicos de rayos-X para los tres ejes de simetría. Es la primera vez que los tres ejes de simetría de un virus icosaédrico se distinguen sin ambigüedad en imágenes de AFM mediante la resolución de las características topográficas en cada uno de ellos. Si comparamos las imágenes de los modelos de rayos-X con las de AFM, observamos que el acuerdo entre ambas técnicas es notable, a pesar de que los modelos estructurales

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

cristalográficos muestran características topográficas que son el promedio de muchas imágenes, mientras que las imágenes de AFM muestran la topografía de partículas individuales. De las todas imágenes de AFM obtenidas de cápsidas vacías y de viriones llenos de ADN, ambos orientados a lo largo de los tres ejes de simetría, no observamos diferencias entre ellos en las dimensiones o características topográficas que presentaron, es decir, cápsidas y viriones son estructuralmente indiscernibles.



**Figura 5.9.** (a) Partículas individuales del MVM observadas a lo largo del eje de S5, (b) del eje de S3 y (c) del eje de S2. La primera fila representa un dibujo simplificado de una partícula icosaédrica orientada en los tres ejes de simetría. La segunda fila corresponde a los modelos atómicos de los datos cristalográficos. La tercera fila muestra las imágenes de AFM (tamaño de las imágenes 60×60 nm), revelando las mismas características topográficas locales observadas en los modelos atómicos. Las topografías aparecen lateralmente expandidas debido a los efectos de dilatación entre la punta y la muestra.

### 5.5. PROPIEDADES MÉCANICAS DEL MVM

Estudiar las propiedades mecánicas de biomoléculas es importante para entender la relación existente entre la estructura física que presentan y la función biológica que desempeñan [Hamm 2003], así como para la posible aplicación de biomateriales en la fabricación de estructuras moleculares [Goodman 2005]. Sin embargo, el estudio de las grandes asociaciones biopoliméricas es de gran complejidad, no solo por su tamaño, sino también por la gran variedad de procesos y factores externos que determinan su

ensamblaje, estabilidad y disociación. Por esta razón las cápsidas víricas más sencillas constituyen modelos muy atractivos para el estudio de las propiedades mecánicas de ensamblados biomacromoleculares.

#### **5.5.1. Un nuevo campo aún por explorar**

Las cápsidas de los virus han adquirido soluciones estructurales únicas en respuesta a las diversas funciones que tienen que llevar a cabo durante el ciclo de infección viral. Entre ellas podemos citar el mantenimiento de su estabilidad y la integridad del genoma en el entorno extracelular a pesar de las múltiples agresiones físicas y químicas a las que se encuentran sometidas [Chiu 1997; Moody 1999]. Aunque la cristalografía de rayos-X y la criomicroscopía electrónica han revelado las estructuras tridimensionales de muchos virus con una resolución muy elevada [Tao 1998], éstas no pueden explicar por sí mismas el comportamiento dinámico del virus en su medio fisiológico. Estudios realizados por diferentes grupos mediante la utilización de diferentes técnicas fisicoquímicas, como la espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular o calorimetría diferencial de barrido [Carreira 2004] han aportado información sobre la estabilidad química o térmica de las partículas víricas y la presencia de cambios conformacionales en su estructura. El análisis de cápsidas y virus variantes, obtenidos mediante mutagénesis dirigida, ha permitido investigar las razones estructurales de diferentes propiedades funcionales de virus y cápsidas. Probablemente, como parte de la adaptación a un entorno complejo y en respuesta a múltiples presiones selectivas, las cápsidas víricas parecen haber desarrollado algunas propiedades físicas extraordinarias [Bruinsma 2003; Zandi 2004]. Un ejemplo deriva del estudio a nivel individual de los factores implicados en el proceso de empaquetamiento del material genético en bacteriófagos, donde éste debe acomodarse en la cabeza de la procápsida, cuyo diámetro es sólo de varias decenas de nanómetros. En el caso del bacteriófago  $\Phi 29$ , el genoma vírico se acomoda dentro de la cápsida sólo si la distancia entre cadenas vecinas de ADN es un poco mayor que su diámetro (2 nm), con lo que el estado condensado de ADN alcanza densidades cristalinas [Tao 1998]. Debido a esta situación se ha estimado que la presión ejercida por el ADN desde dentro hacia fuera del virus es del orden de 6 MPa [Smith 2001]. En otros trabajos, utilizando microscopía de fuerzas en líquidos [de Pablo 2003] se ha estimado que la tensión de rotura de una cápsida de  $\Phi 29$  es de  $\sim 0.33$  GPa [Ivanovska 2004], casi dos órdenes de magnitud

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

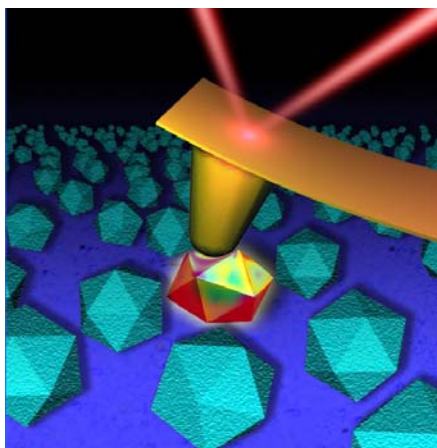
superior a la presión interna ejercida por el ADN. El bacteriófago  $\lambda$  también soporta una alta presión interna ejercida por el ADN encapsulado [Evilevitch 2003]. Por otra parte, también se ha observado que las cápsidas de algunos virus, como los parvovirus, presentan una gran resistencia a la disociación mediante calentamiento [Carreira 2004]. Estas características extraordinarias convierten a las cápsidas víricas y a los viriones en candidatos únicos para el estudio de propiedades mecánicas de objetos nanométricos y la evaluación de sus posibles aplicaciones nanotecnológicas, como por ejemplo la encapsulación de diversos materiales [Douglas 1998; Douglas 2006]. ¿Qué hace que una partícula vírica pueda soportar elevadísimas presiones internas o temperaturas? ¿Qué propiedades mecánicas especiales han adquirido las partículas víricas para poder llevar a cabo con éxito su ciclo biológico? La nanotecnología encuentra una de sus máximas expresiones en los virus. Las propiedades mecánicas de las partículas víricas deben estar relacionadas con la posibilidad de cambios conformacionales, necesarios para realizar su función infecciosa, y con su estabilidad, capaz de soportar choques osmóticos y cambios de pH en el medio fisiológico donde se encuentran [Moody 1999].

La elasticidad de las partículas víricas puede ser analizada mediante la aplicación de fuerzas de indentación realizadas con la punta de la micropalanca del AFM. El empleo de este método sobre los fagos  $\Phi 29$  [Ivanovska 2004] y  $\lambda$  [Ivanovska 2007] y sobre el virus *cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) [Michel 2006], todos ellos virus sin envoltura lipídica, ha desvelado que son estructuras mecánicamente robustas a la vez que poseen interesante propiedades elásticas. En dos retrovirus con envoltura lipídica, el *moloney murine leukemia virus* y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), se ha demostrado que el virión inmaduro es relativamente más duro que el virión maduro infeccioso [Kol 2006; Kol 2007]. Nosotros vamos a realizar un estudio comparativo de las propiedades mecánicas de las cápsidas vacías y viriones llenos de material genético (ADN) del MVM en función de los ejes de simetría de estas partículas icosaédricas. De esta forma conoceremos la influencia del material genético en las propiedades mecánicas del virus, las cuales podrían ser relacionadas con el ciclo biológico del mismo.

### 5.5.2. Resultados experimentales para cápsidas y viriones

Para medir las propiedades mecánicas de las partículas del MVM, realizamos nanoindentaciones sobre partículas individuales intactas (apartado 2.4). El hecho de

poder distinguir las características topográficas que las partículas del MVM presentan en lo largo de los tres ejes de simetría en las imágenes de AFM nos va a permitir estudiar las propiedades mecánicas para cápsidas vacía y para viriones llenos de ADN en función de los ejes de simetría. La orientación de cada partícula individual es determinada por comparación de las imágenes de AFM con las del modelo cristalográfico (Fig. 5.9). Sólo aquellas partículas que claramente presentan su eje de simetría en el centro de la imagen son seleccionadas para realizar las indentaciones. El resto de partículas, que presentan el eje de simetría descentrado o cuya simetría no es reconocible tanto en la imagen anterior como en la posterior a la indentación, son descartadas para el análisis. De esta forma, las curvas *FZs* son realizadas en las tres orientaciones específicas dadas por los ejes de simetría (Fig. 5.10).



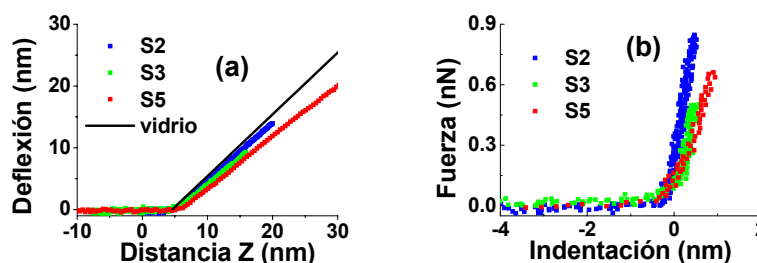
**Figura 5.10.** Dibujo esquemático del procedimiento experimental. Las partículas víricas individuales se encuentran adsorbidas sobre una superficie de vidrio en medio líquido. Muchas partículas están orientadas a lo largo de un eje de simetría concreto. Sobre una de ellas, seleccionada previamente, la micropalanca del microscopio de fuerzas ejerce una presión, donde la deflexión del reflejo del láser proporciona una medida de la fuerza aplicada.

Para la realización de las curvas *FZs* utilizamos la micropalanca RC800PSA de constante muelle nominal  $k = 0.05 \text{ N/m}$ , la cual calibramos en todos los experimentos [Sader 1999]. El uso de micropalancas más duras, por ejemplo con  $k = 0.3 \text{ N/m}$ , induce el movimiento de las partículas adsorbidas sobre la superficie y también puede provocar daños irreversibles en la estructura de las mismas. Estos factores impiden visualizar una orientación clara de las cápsidas. Este hecho tiene su origen en la componente lateral de la fuerza normal [Moreno-Herrero 2000], la cual tiene relevancia en los casos donde existe un ángulo entre la punta y la muestra, como ocurre cuando la punta se encuentra con el borde de la partícula (apartado 1.4.2.3). En estos casos, la constante de muelle lateral de la micropalanca es  $\sim 40$  veces mayor que la normal

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

[Carpick 1997], por lo que se deben escoger micropalanca blandas para conservar la integridad estructural de las partículas víricas depositadas sobre la superficie.

Las curvas  $FZs$  realizadas sobre cápsidas y viriones muestran un comportamiento lineal (Fig. 5.11), típico de la mecánica de los sistemas de “cáscara fina” o “*thin-shell*”, para indentaciones del orden del espesor de la pared del objeto [Landau 1986]. La figura 5.11 muestra un ejemplo de curvas de deflexión y curvas de indentación promediadas para viriones del MVM cuando son sometidos a una fuerza radial a lo largo de los tres ejes de simetría.



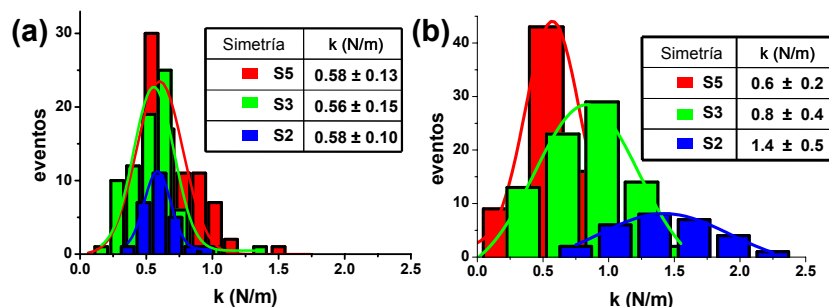
**Figura. 5.11.** (a) Curvas de deflexión y (b) curvas de indentación para el virión del MVM cuando se aplica una fuerza a lo largo de los ejes de S2 (azul), S3 (verde) y S5 (rojo). La línea negra en (a) corresponde a la curva de deflexión sobre una superficie de vidrio. Cada curva de indentación en (b) es el promedio de 5 curvas realizadas con la misma micropalanca sobre cada tipo de eje de simetría en una misma sesión experimental. Cada curva de deflexión en (a) muestra una curva típica de las 5 medidas.

La fuerza aplicada máxima en las curvas  $FZs$  está limitada a 0.9 nN realizando una indentación menor de 2 nm. Después de varios eventos de contacto con la partícula, la curva  $FZ$  suele mostrar unos saltos que corresponden a diversas modificaciones irreversibles de la partícula. Cuando esto ocurre movemos la micropalanca a otra zona de la superficie para estudiar una nueva partícula intacta. Cada una de las curvas  $FZs$  analizadas se ajusta linealmente para obtener la constante elástica de muelle  $k$  a lo largo de la dirección de la fuerza aplicada, asumiendo nuevamente el virus y la micropalanca como dos muelles en serie (sección 2.4).

Realizamos las curvas de indentación en la dirección de los tres ejes de simetría para las cápsidas vacías y posteriormente para los viriones llenos de ADN. Para las cápsidas vacías obtuvimos un total de 194 curvas  $FZs$  realizadas sobre 23 partículas individuales, correspondiendo respectivamente 7, 11, y 5 partículas a orientaciones en las direcciones de los ejes S5, S3 y S2. Para el caso de los viriones llenos de ADN

obtuvimos 155 curvas  $FZ$ s realizadas sobre 28 partículas individuales, correspondiendo respectivamente 9, 11, y 8 partículas orientadas a lo largo de los ejes S5, S3 y S2.

Las constantes elásticas de muelle obtenidas para las cápsidas vacías en cada orientación son representadas en un histograma (Fig. 5.12.a). Los ajustes gaussianos de los histogramas revelan valores de las constantes elásticas de muelle de  $0.58 \pm 0.13$ ,  $0.56 \pm 0.15$  y  $0.58 \pm 0.10$  N/m a lo largo de los ejes S5, S3 y S2 respectivamente, mostrando que el comportamiento mecánico de la cápsida vacía del MVM, dentro del error experimental, es isótropo ya que la constante elástica para las tres orientaciones de simetría es similar. De igual forma, las constantes elásticas de muelle obtenidas para los viriones individuales llenos de ADN en cada orientación son representadas en otros histogramas (Fig. 5.12.b). Los ajustes gaussianos de estos histogramas revelan valores de las constantes elásticas de  $0.6 \pm 0.2$ ,  $0.8 \pm 0.4$  y  $1.4 \pm 0.5$  N/m a lo largo de los ejes S5, S3 y S2 respectivamente.



**Figura 5.12.** Comparación de las propiedades mecánicas de cápsidas vacías (a) y viriones llenos de ADN (b). Los histogramas de ambas gráficas representan los valores de las constantes elásticas de muelle  $k$  obtenidos para partículas individuales sometidas a una indentación radial a lo largo del eje de S5 (rojo), del eje de S3 (verde) y del eje de S2 (azul). Las tablas en cada gráfica muestran los valores de  $k$  de los ajustes gaussianos de los histogramas a lo largo de cada uno de los ejes de simetría junto a las desviaciones estándares. La aplicación del test de t-Student indica con una confianza >99% que los tres valores medios mostrados en (b) no solapan.

Si comparamos los valores obtenidos de la constante elástica de muelle de la cápsida vacía con los del virión lleno de ADN para cada una de las orientaciones observamos que la presencia del material genético provoca un aumento de la dureza de la partícula del 3%, 42% y 140 % a lo largo de los ejes S5, S3 y S2 respectivamente. Si nos detenemos en los valores de los ajustes gaussianos de  $k$  mostrados en las tablas de la figura 5.12, observamos que las desviaciones más altas de los valores de  $k$  se obtienen para los viriones con respecto a las cápsidas vacías, especialmente a lo largo

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

del eje de S2. Si las desviaciones fuesen debidas solamente al error experimental, deberían ser similares para las cápsidas vacías o viriones. Las desviaciones mayores probablemente reflejan una distribución gaussiana más ancha de los valores de la dureza real. La razón de esto puede deberse principalmente a dos causas: en primer lugar, a la existencia de un pequeño desplazamiento en las orientaciones de la punta y de la partícula después de cada indentación, hecho observado ocasionalmente en las imágenes. Si hubiese realmente una diferencia de dureza en el virión en función de la orientación de la partícula, esto provocaría que cuando se realicen indentaciones en posiciones ligeramente fuera del eje, se produzcan también pequeñas diferencias en el valor de  $k$  obtenido en cada indentación, aún cuando estemos analizando una misma partícula individual. Y en segundo lugar, tenemos la asimetría intrínseca de la molécula de ADN de cadena lineal. Debido a esta asimetría, los 60-n ejes ( $n = 5, 3, 2$ ) no son estrictamente equivalentes en el virión, lo que puede provocar la obtención de valores de  $k$  ligeramente diferentes en función del eje específico al que estemos aplicando la fuerza. Este hecho, lógicamente, no sucede en la cápsida vacía de ADN. Debido a que los segmentos de unión ADN-cápsida están localizados más cerca de los ejes de S2 y más lejos de los ejes de S5 (Fig. 5.14), este efecto será mayor cuando los viriones son indentados a lo largo de un eje de S2, lo cual es consistente con los resultados experimentales. Ya que la sensibilidad de las medidas mecánicas es reducida cuando la micropalanca es muy blanda en comparación con la muestra, los errores experimentales podrían ser reducidos utilizando una micropalanca más dura. Pero como comentamos, esto resulta técnicamente muy difícil. Por otro lado, realizamos un análisis estadístico de los valores obtenidos usando el test de t-Student indicándonos, con una confianza del 99%, que los valores promedios de  $k$  obtenidos para el virión a lo largo de los diferentes ejes de simetría son significativamente diferentes. Por otra parte, el incremento del valor de  $k$  a lo largo del eje de S2 con respecto a los otros ejes de simetría no puede deberse a la densidad de carga de los parches de ADN cercanos al eje de S2, ya que estos parches se encuentran en el interior de la cápsida y lejos de la superficie exterior de la misma. Podemos concluir señalando que la presencia del material genético en el interior del virión provoca un reforzamiento mecánico vectorial de su estructura que depende de la orientación o eje de simetría.



### 5.5.3. Modelo del comportamiento mecánico del MVM

Para entender cómo el material genético puede afectar anisótricamente a las propiedades mecánicas de los viriones, realizamos un modelo mecánico de un icosaedro sencillo mediante métodos de elementos finitos [FEMLAB 3.1i] basándonos en el modelo mecánico de “cáscara fina” o “*thin-shell*”. Construimos un icosaedro hueco y homogéneo con un módulo de Young de 1.25 GPa formado por 20 caras triangulares del mismo espesor y un diámetro exterior de  $\sim 25$  nm, aproximadamente igual al diámetro nominal del MVM. Debido a que las caras icosaédricas de la partícula del MVM son convexas, para bajas indentaciones es correcto considerar el contacto entre punta y muestra como una fuerza puntual [Schaap 2006]. Por lo que la fuerza aplicada es modelada como una fuerza puntual que indenta radialmente al icosaedro apoyado sobre una superficie virtual no deformable (Fig. 5.13.a).

La hipótesis más simple es considerar que la molécula de ADN puede reforzar la cápsida vírica tapizando la pared interior, incrementando así de forma homogénea el espesor efectivo de la pared del virus. A partir de las simulaciones de nanoindentación realizadas según este modelo, podemos obtener los valores de las constantes de muelle  $k$  en función del espesor de la pared  $t$  del icosaedro. Observamos que los valores de las constantes de muelle  $k$  dependen de la orientación de la partícula (Fig. 5.13.b). Además las curvas obtenidas para los tres ejes de simetría se cortan cuando el espesor  $t$  es aproximadamente 2 nm. Este resultado es consistente con la constante de muelle isótropa obtenida para el caso de la cápsida vacía, para el cual los datos cristalográficos muestran un espesor mínimo de pared de  $\sim 2$  nm. A espesores de pared mayores a 2 nm, las constantes de muelle a lo largo de los diferentes ejes de simetría se incrementan de forma anisótropa. Pero dicha anisotropía no se corresponde con la que encontramos en los resultados experimentales para el virus lleno de ADN, donde la constante de muelle para el eje de S2 es mayor que para el eje de S3. Por consiguiente, el modelo de pared con espesor homogéneo es consistente con el virus vacío, pero no para el virus lleno de ADN. Para parvovirus, como el MVM, no hay evidencias experimentales que indiquen ninguna interacción entre el ADN y las proteínas de la cápsida, excepto en las 60 zonas de unión visibles cristalográficamente [Tsao 1991; Agbandje-McKenna 1998; Kontou 2005]. Sí pueden tener lugar ciertas interacciones entre algunos fosfatos del ADN y regiones básicas de los segmentos N-terminales internos de las proteínas de la cápsida. Pero

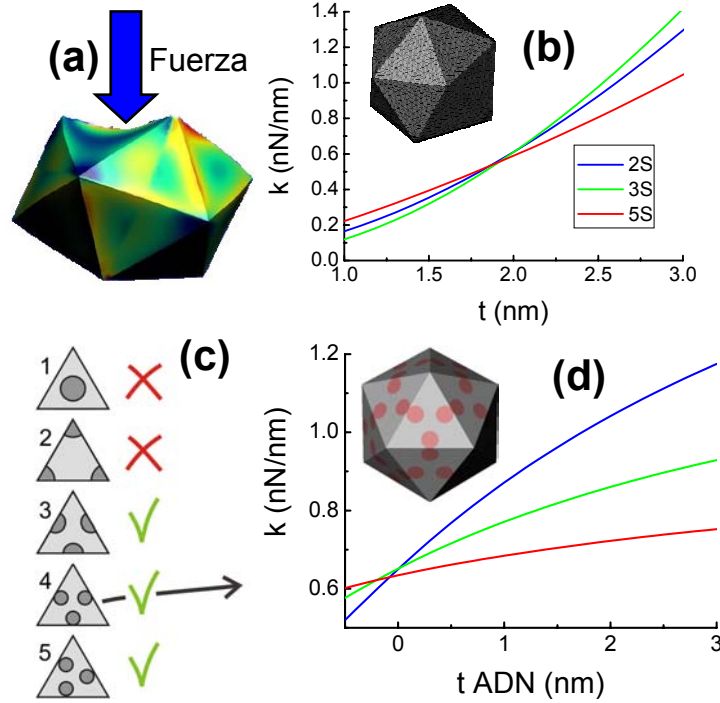
## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

estos segmentos están débilmente conectados a las proteínas de la cápsida, por lo que estas uniones no refuerzan la pared de la cápsida.

La segunda hipótesis es asumir que el reforzamiento mecánico del virus lleno de ADN es principalmente debido a las extensiones de ADN, que a modo de cuña se insertan en 60 cavidades diferentes distribuidas simétricamente cerca de los ejes de S2, uniéndose así a la pared interna del virus (Fig. 5.14). Estas extensiones de ADN incrementan el espesor efectivo de la pared de forma local sólo en determinadas posiciones. Exploramos esta hipótesis con un modelo de elementos finitos, donde partimos de un icosaedro con un espesor inicial de pared de 2 nm para incluir el valor isotrópico de la cápsida vacía. Después aumentamos el espesor de la pared localmente, mediante la adición de zonas circulares o parches de espesor  $t_{ADN}$  que simulan las uniones del ADN a la pared interna. De esta forma, calculamos las constantes de muelle en función del espesor local  $t_{ADN}$  en 5 modelos diferentes que difieren en la localización de los parches circulares (Fig. 5.13.c) para tener en cuenta la falta de definición de la localización exacta de la zona de interacción del ADN con la cápsida.

Encontramos que los modelos que mejor ajustan los resultados experimentales son los que presentan los reforzamientos de los parches circulares en las posiciones del icosaedro donde, aproximadamente, se encuentran las cuñas de ADN según los datos cristalográficos (modelo 4, figura 5.13.c). Este modelo predice un incremento anisótropo de las constantes elásticas de muelle en función del eje de simetría similar al encontrado en los experimentos (Fig. 5.13.d), es decir, la constante elástica es mucho mayor para eje de S2, algo más baja para el eje de S3 y mucho más baja para el eje de S5 (Fig. 5.12.b). Pequeños cambios en la posición de los parches circulares (modelos 3 y 5, figura 5.13.c) conducen a resultados similares, manteniéndose la anisotropía del modelo 4. Sin embargo, los modelos 1 y 2, en los que los parches circulares están situados en posiciones diferentes a las reales del ADN en el virión, es decir, lejos del eje de S2 y cerca de los ejes de S3 y S5 conducen a predicciones opuestas a las que encontramos en los resultados experimentales.

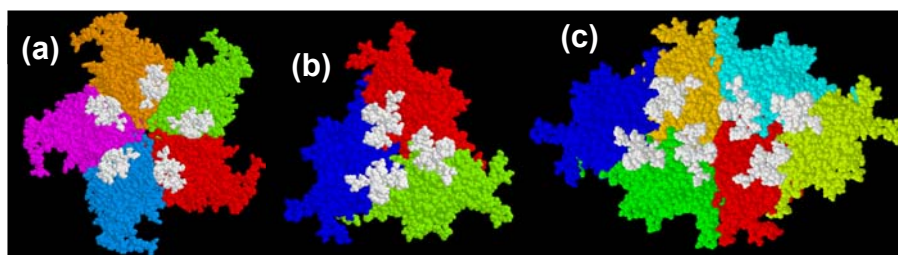


**Figura 5.13.** Modelo de elementos finitos. (a) Dibujo esquemático de la deformación predicha para una partícula icosaédrica cuando se le aplica una fuerza puntual. La escala de colores indica la distribución de las tensiones mecánicas en el icosaedro (los colores más oscuros muestran las zonas con menos tensión). (b) Gráfica que muestra la constante de muelle  $k$  a lo largo de los ejes de S2 (azul), S3 (verde) y S5 (rojo) en función del espesor de la pared  $t$ . El dibujo corresponde al modelo de icosaedro homogéneo usado en la simulación. (c) Dibujos de cinco modelos diferentes del icosaedro reforzado con parches circulares de espesor  $t_{ADN}$  localizados en diferentes posiciones. Sólo se muestra 1 de las 20 caras del icosaedro para cada modelo. Los modelos 1 y 2 no predicen el comportamiento experimental observado. Los modelos 3, 4 y 5 revelan un pequeño aumento de  $k$  a lo largo del eje de S5 y mucho mayor a lo largo del eje de S2. (d) Gráfica que representa la constante de muelle  $k$  a lo largo de los ejes de S2 (azul), S3 (verde) y S5 (rojo) en función del espesor  $t_{ADN}$  de los parches circulares, cuyas posiciones en el icosaedro se corresponden con las mostradas en el modelo 4. Estas posiciones coinciden con las localizaciones periódicas donde el ADN ordenado es visualizado unido a la pared interna de la cápsida del virión. El dibujo muestra el modelo 4 completo.

El objetivo del modelo de elementos finitos no es reproducir el comportamiento mecánico cuantitativo del virión sino caracterizar la tendencia cualitativa de la anisotropía mecánica. Las extensiones de ADN y sus correspondientes sitios de unión en la pared interna del virus podrían ser descritas como cuñas de ADN que rellenan las cavidades de la pared. Estas cavidades cederían fácilmente en un virus vacío cuando éste es deformado por la punta de AFM. Sin embargo, en el virus lleno de ADN, dichas

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

cavidades no podrían deformarse por encontrarse dentro el ADN actuando a modo de cuña. Las diferentes posiciones de las zonas de unión del ADN con respecto a los diferentes ejes de simetría (Fig. 5.14) explican la anisotropía en la respuesta mecánica del virión en función de cada uno. Para entender exactamente cómo la molécula de ácido nucleico contribuye al aumento de la dureza del MVM necesitaríamos una descripción estructural completa del ácido nucleico en el interior de la partícula. Pero, tal descripción no está aún disponible para ningún tipo de virus icosaédrico, ya que la mayoría del material genético vírico está distribuido asimétricamente en el interior del virión, por lo que no puede ser visualizado. Sin embargo, para muchos virus se han encontrado evidencias sobre la presencia de ciertas interacciones entre la cápsida y el ácido nucleico [Casjens 1997; Johnson 1997] y de la existencia de una capa de ácido nucleico que se encuentra parcialmente ordenado en las proximidades de la pared interna de la cápsida [Baker 1999]. Por ello, nuestro modelo de elementos finitos inicial fue diseñado para simular el efecto de un aumento global en el espesor de la pared debido a la presencia del ADN, pero como vimos, este modelo no reproduce los resultados experimentales. Basándonos en el modelo final propuesto, podríamos especular acerca del papel estructural del ADN que permanece desordenado (~70%) en el interior de la cápsida. Ya que los experimentos se pueden entender asumiendo que sólo el ADN cristalográficamente visible contribuye al reforzamiento mecánico del virus, es plausible pensar que el ADN desordenado está distribuido dentro de la cápsida sin fuertes interacciones con la pared interior del virus.



**Figura 5.14.** Representaciones con modelos de van der Waals de diferentes zonas de la pared interna del virión, donde se muestran varias proteínas de la cápsida del MVM (diferentes colores) y el ADN visualizado por cristalografía unido a ellas (color blanco). (a) Cinco proteínas relacionadas por un eje de S5. (b) Tres proteínas relacionadas por un eje de S3. (c) Seis proteínas relacionadas por un eje de S2. Las distancias medidas muestran que el centro de gravedad de cada extensión de ADN visible está localizado, en la pared interna de la cápsida, más cerca del eje de S2 y más lejos del eje de S5.

#### 5.5.4. Implicaciones de los resultados

Los resultados presentados aquí junto con otras evidencias experimentales [Casjens 1997; Bothner 1999], muestran que el material genético, en al menos algunos virus pequeños, no sólo lleva información de forma pasiva, sino que participa activamente como un componente material en la estructura, propiedades, y/o funciones del virión. En el MVM, el ADN genómico contribuye a la termoestabilidad del virión infeccioso a través de las interacciones entre la cápsida y las extensiones de ADN visibles cristalográficamente [Reguera 2005]. Nuestro trabajo proporciona una evidencia directa de la participación del ácido nucleico genómico en el reforzamiento mecánico anisótropo del virión.

En relación con las implicaciones biológicas de nuestras observaciones, cabe plantearse la posibilidad de que la naturaleza podría haber tomado ventaja de la presencia de material genético en el interior de la cápsida del virión para desarrollar uniones periódicas entre la cápsida y el ADN por mutación y selección, reforzando mecánicamente a la partícula. Este reforzamiento puede ser necesario por al menos dos razones. Primero, podemos estimar la densidad de empaquetamiento del ácido nucleico dentro del virus, calculando el valor de la eficiencia de empaquetamiento  $\rho$  [Purohit 2005] y el volumen interno de la cápsida ocupado por dalton de ácido nucleico empaquetado  $Vm$  [Johnson 1997]. Ambos valores calculados para el MVM (~35% y 1.7 Å<sup>3</sup>/Da respectivamente) indican que la densidad de empaquetamiento en el MVM es muy alta, superando incluso la de los cristales de ADN de cadena simple y aproximándose a la encontrada en el bacteriófago  $\Phi 29$  [Purohit 2005], el cual se encuentra sometido a una alta presión interna debido al empaquetamiento del ácido nucleico [Smith 2001]. Segundo, a diferencia de otros virus, en el MVM los residuos básicos de la cápsida no neutralizan de forma sustancial las cargas negativas de los fosfatos del ADN [Reguera 2005]. Por lo que, tanto la alta densidad de empaquetamiento como la repulsión mutua entre los fosfatos del ADN, pueden generar una presión interna considerable. La inserción del ADN en las cavidades de la pared interna del virus podría originar el reforzamiento mecánico necesario para resistir dicha presión.

El reforzamiento anisótropo del virión también puede estar relacionado con otros procesos biológicos. La entrada y salida del ADN vírico y la extrusión de los segmentos N-terminales de algunas de las subunidades proteicas de la cápsida son

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

necesarias para la infectividad. Hay evidencias experimentales que indican que estos eventos de translocación ocurren a través de los poros localizados en los ejes de S5 [Tsao 1991; Agbandje-McKenna 1998; Cotmore 1999; Hernando 2000; Reguera 2004; Kontou 2005; Reguera 2005]. De hecho, algunos de estos eventos son alterados por mutación de residuos localizados cerca de los poros, evitándose ciertos cambios conformacionales necesarios, lo que provoca una reducción de la infectividad del virus [Cotmore 1999; Reguera 2004; Kontou 2005; Carreira 2006]. La finalización del ciclo biológico del MVM probablemente requiera de una cierta flexibilidad de la cápsida, al menos alrededor de los poros en los ejes de S5 [Cotmore 1999; Reguera 2004; Kontou 2005; Carreira 2006]. Nuestros resultados experimentales nos conducen a proponer sugerentemente que la rigidez mecánica anisótropa del virión MVM, la cual es más baja alrededor del eje de S5 donde se encuentran los poros, podría tener un papel biológico adaptativo para permitir una máxima dureza de la partícula pero sin cancelar los cambios conformacionales necesarios para la infectividad del virus.

Más allá de las implicaciones biológicas, el virus MVM aquí estudiado es un ejemplo palpable de una red de ADN tridimensional que interactúa con las proteínas de la cápsida para adaptar sus propiedades mecánicas a sus necesidades biológicas. Hay que destacar que durante los últimos años se ha dedicado un gran esfuerzo para fabricar redes tridimensionales de ADN [Shih 2004] y sólo recientemente se ha demostrado la posibilidad de usar el ADN para construir estructuras rígidas [Goodman 2005]. La comprensión de estas propiedades a nivel nanométrico nos enseña la forma en que la naturaleza ha resuelto determinados problemas estructurales y funcionales, lo cual puede ser imitado para la fabricación de objetos de tamaño nanométrico con determinadas propiedades mecánicas y materiales bio-inspirados, como nanocontenedores [Douglas 1998].

### 5.6. MANIPULACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DEL MVM

El conocimiento de la relación entre las funciones y la estructura de los virus proporciona una visión de cómo los viriones más simples actúan como nanomáquinas optimizadas que llevan a cabo funciones complejas con una estructura minimalista. Muchos experimentos muestran que la gran mayoría de las mutaciones hechas en las

cápsidas de muchos virus, incluyendo al MVM, reducen o eliminan la infectividad. Estas mutaciones pueden afectar al proceso de reconocimiento del receptor celular, a la translocación del virus, empaquetamiento del ácido nucleico, cambios conformacionales necesarios para la infectividad, etc., por lo que sólo estructuras y secuencias de aminoácidos muy específicas de las proteínas de la cápsida permiten la realización de muchas de las funciones complejas que se requieren para supervivencia del virus.

En el apartado anterior hemos mostrado una evidencia directa de cómo el ADN genómico juega un papel estructural mediante un reforzamiento mecánico anisótropo de la partícula del MVM. Pero el material genético no siempre refuerza anisótricamente a las partículas víricas. Por ejemplo, para el fago  $\lambda$  [Ivanovska 2007] y el virus CCMV [Michel 2006] se ha observado también un reforzamiento mecánico en los viriones, aunque de forma isotropa. El uso de un modelo de elementos finitos nos ha permitido predecir que el reforzamiento mecánico del virus MVM puede ser atribuido a las 60 zonas de unión del ADN con la pared interna de la cápsida. Sin embargo, este modelo está basado en suposiciones que quizás puedan ser demasiado simplistas, por lo que la comprobación de cualquier modelo teórico para predecir de qué forma las propiedades mecánicas de un virus u otra estructura supramolecular pueden ser modificadas cuando se introducen o se eliminan ciertas interacciones intermoleculares queda aún por validar experimentalmente.

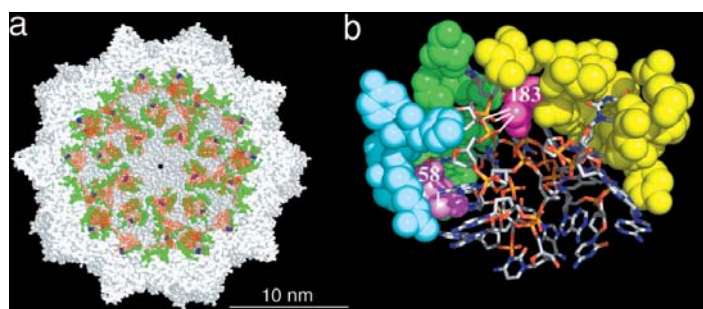
El objetivo ahora es comprobar experimentalmente si las predicciones del modelo de FEM son correctas o no. Para ello vamos a hacer uso de la ingeniería de proteínas creando mutaciones selectivas, las cuales van a eliminar algunas de las interacciones del ADN con la pared interna de la cápsida y compararemos las propiedades mecánicas de los virus con mutaciones con aquellas obtenidas para los virus sin mutar.

### **5.6.1. Elección de los mutantes y su resolución estructural por AFM en medio líquido**

En el modelo cristalográfico refinado del MVM [Kontou 2005] se observa que cada una de las 60 zonas equivalentes de unión entre el ADN visible y ordenado y la pared interna de la cápsida, incluye dos extensiones cortas de 11 y 8 nucleótidos. Esta zona o parche de ADN adopta una forma de cuña que penetra y rellena una concavidad

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

en la pared interna de la cápsida, estableciendo interacciones no covalentes con residuos de varios aminoácidos de las proteínas de la cápsida [Agbandje-McKenna 1998; Reguera 2005] (Fig. 5.15). Para determinar si estas interacciones específicas son las responsables del reforzamiento mecánico producido por el ADN en el virión, procedemos a analizar el efecto que pueden producir ciertas mutaciones sobre algunos residuos específicos de la cápsida en las propiedades mecánicas de las partículas del MVM. Sólo dos únicas mutaciones, Asn183Ala y Asp58Ala, van a ser necesarias para eliminar las principales interacciones en las uniones entre el ADN y la cápsida, a la vez que también preservamos las interacciones intracápsidas. La mutación de los residuos Asn-183 y Asp-58 dirigida hacia el aminoácido Alanina (Ala) implica la eliminación del grupo amino y del grupo carboxilo respectivamente. Esta mutación se escoge por dos razones principales: por un lado, para eliminar las interacciones nativas sin introducir nuevas interacciones y por otro, porque hay muy baja probabilidad de alterar la conformación de la estructura polipeptídica [Cunningham 1989; Lau 1989].



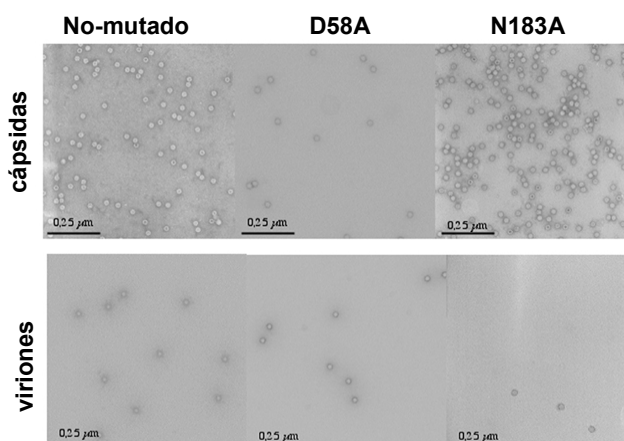
**Figura. 5.15.** Zonas de unión ADN-cápsida en el virión MVM. (a) Corte transversal del modelo cristalográfico del virión MVM. Las extensiones visibles y ordenadas de ADN (color rojo) están unidas a residuos específicos de los aminoácidos (color verde, excepto el residuo Asn-183 de color azul) en zonas equivalentes de la pared interna de la cápsida. El resto de la molécula de ADN y el segmento interno N-terminal de cada proteína de la cápsida son invisibles cristalográficamente. En esta orientación, uno de los ejes de S5 está localizado en el centro del modelo (punto negro central). (b) Vista interior de una de las 60 zonas de unión ADN-cápsida. Las dos extensiones del ADN que forman cada zona de unión están representados mediante modelos de varillas. Los residuos de la cápsida que establecen interacciones con el ADN (excepto Asp-58 y Asn-183) están representados en color azul, verde y amarillo con modelos de van der Waals, de acuerdo a las proteínas involucradas. Los dos residuos de aminoácidos que son mutados, Asp-58 y Asn-183, se muestran en violeta y magenta respectivamente, representando como líneas blancas los enlaces de hidrógeno que establecen con el ADN.

En el modelo refinado del virión del MVM [Kontou 2005], el grupo amino de Asn-183 y el grupo carboxilo de Asp-58 están respectivamente involucrados en enlaces de hidrógeno con la estructura de los fosfatos y con los nucleótidos de la extensión más



larga del ADN unido a la cápsida (Fig. 5.15.b). También establecen varios contactos de tipo van der Waals con el ADN. En la estructura refinada del parvovirus canino homólogo se observan interacciones similares entre el ADN y los residuos de la cápsida Asn-180 y Asn-56 [Tsao 1991; Chapman 1995; Reguera 2005]. Este hecho apoya la presencia y relevancia funcional de esas interacciones en la estructura de estos virus. Ninguno de los átomos que se eliminan en cualquiera de las mutaciones realizadas se encuentra involucrado en las interacciones intracápsidas.

Se usaron dos clones infecciosos de ADN correspondientes al MVM, uno con las correspondientes mutaciones y otro sin mutaciones, para infectar células y producir las cápsidas vacías y los viriones infecciosos llenos de ADN. Tanto las cápsidas vacías como los viriones llenos de ADN, sin mutar y con las mutaciones son visualizados por TEM (Fig. 5.16) y por AFM (Fig. 5.17).

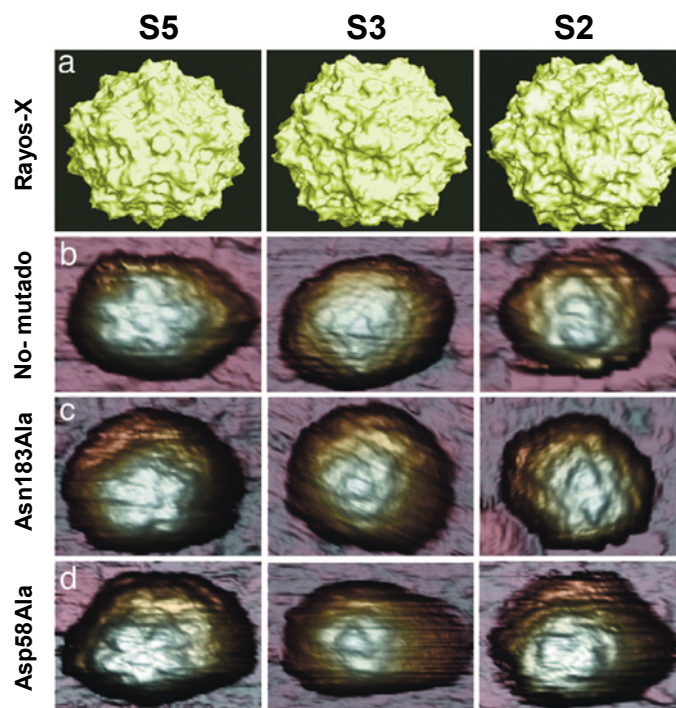


**Figura 5.16.** Imágenes de TEM de cápsidas vacías (primera fila) y de viriones llenos de ADN (segunda fila), sin mutaciones (columna izquierda), con mutaciones D58A (columna central) y con mutaciones N183A (columna derecha). Nótese la gran variación de densidad de partículas.

Si comparamos en la figura 5.16 la población de partículas entre cápsidas vacías (primera fila) y viriones llenos de ADN (segunda fila), tanto para virus sin mutar como para virus con mutaciones, observamos que la densidad de cápsidas vacías es superior a la de viriones, especialmente para el caso del virus sin mutar. Si nos centramos en la densidad de partículas entre los diferentes tipos de viriones, encontramos una densidad menor para el caso de los viriones mutados. Esta diferencia de densidades de población dificulta el trabajo a la hora de encontrar viriones orientados a lo largo de los diferentes

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

ejes de simetría, por lo que el estudio de los viriones va a requerir una búsqueda mucho más costosa y exhaustiva de los mismos.



**Figura. 5.17.** Comparación de las características topográficas del MVM entre los modelos de rayos-X y las imágenes de AFM a lo largo del eje de S5 (izquierda), S3 (centro) y S2 (derecha). (a) Modelo molecular derivado de los datos cristalográficos del virión MVM no mutado. (b-d) Imágenes de AFM (tamaño de las imágenes 60×60 nm) correspondientes a los viriones: (b) no mutado, (c) mutado Asn183Ala y (d) mutado Asp58Ala. La topografía del MVM aparece lateralmente expandida por los efectos de dilación punta-muestra.

De todas las imágenes de AFM (Fig. 5.17.b, 5.17.c y 5.17.d) obtenidas no observamos ninguna diferencia en dimensión, forma y topografía entre las partículas, las cuales para cada orientación son indistinguibles entre sí. De nuevo, en las imágenes de AFM visualizamos las mismas características topográficas que las proporcionadas por las imágenes de rayos-X (Fig. 5.17.a), tanto para cápsidas vacías como para viriones llenos, independientemente de que se trate del virus sin mutar o del virus con mutaciones. Las características más llamativas vuelven a ser las espículas localizadas en los ejes de S3 y las protusiones cilíndricas en los ejes de S5. Estas características topográficas van a servirnos, al igual que en el análisis anterior, para identificar la orientación específica de las partículas sobre la superficie.

### 5.6.2. Propiedades mecánicas de cápsidas y viriones mutados

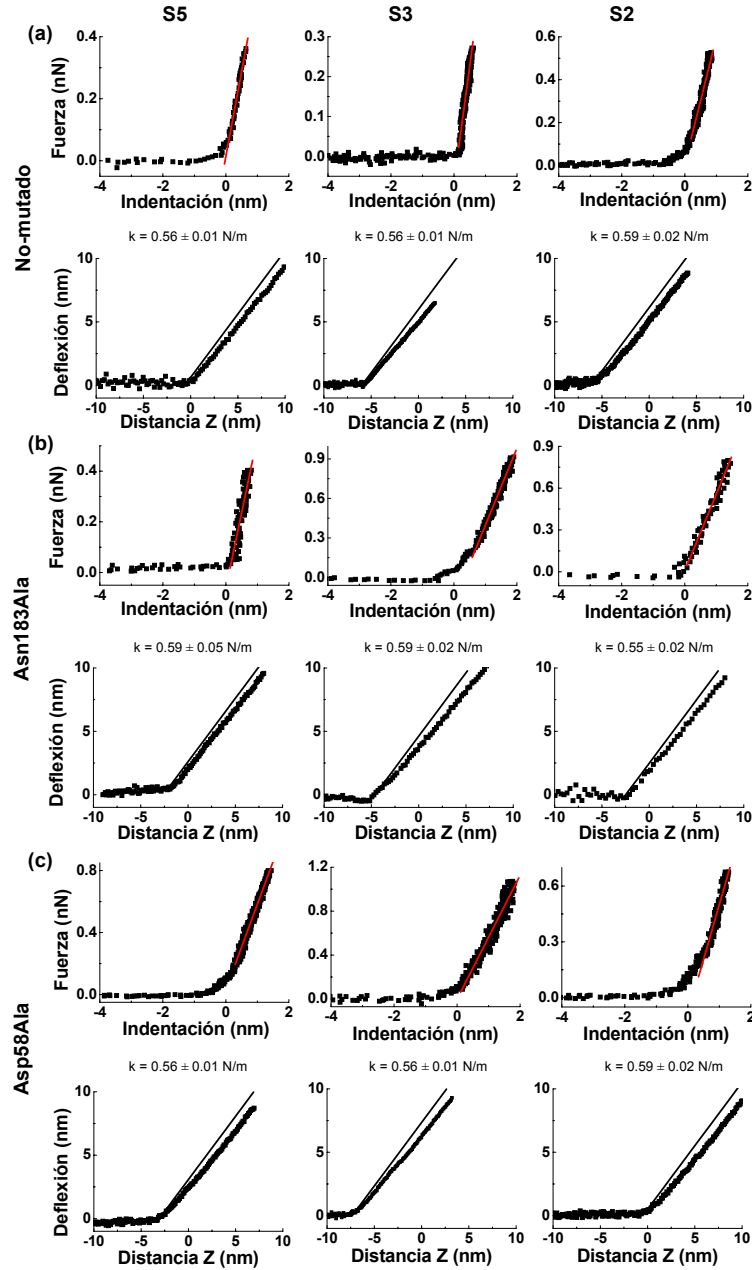
Para determinar cuantitativamente las propiedades elásticas de las partículas del MVM modificadas mediante mutaciones, representamos curvas de nanoindentación sobre partículas intactas individuales procediendo de la misma forma que en el apartado anterior, es decir, aplicando una fuerza en la dirección radial a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 (Fig. 5.10). De nuevo, sólo aquellas partículas que muestran claramente las características topográficas correspondientes a cada eje de simetría en el centro de la imagen son elegidas para realizar las indentaciones mientras que el resto de partículas no se tienen en cuenta.

En el análisis experimental llevado a cabo, el número de cápsidas vacías y viriones llenos utilizados tanto para virus no mutados y como para virus mutados (N183A y D58A) en cada orientación posible de la partícula, así como el número de curvas de indentación realizadas sobre ellas, se encuentran recogidos en la tabla 5.1.

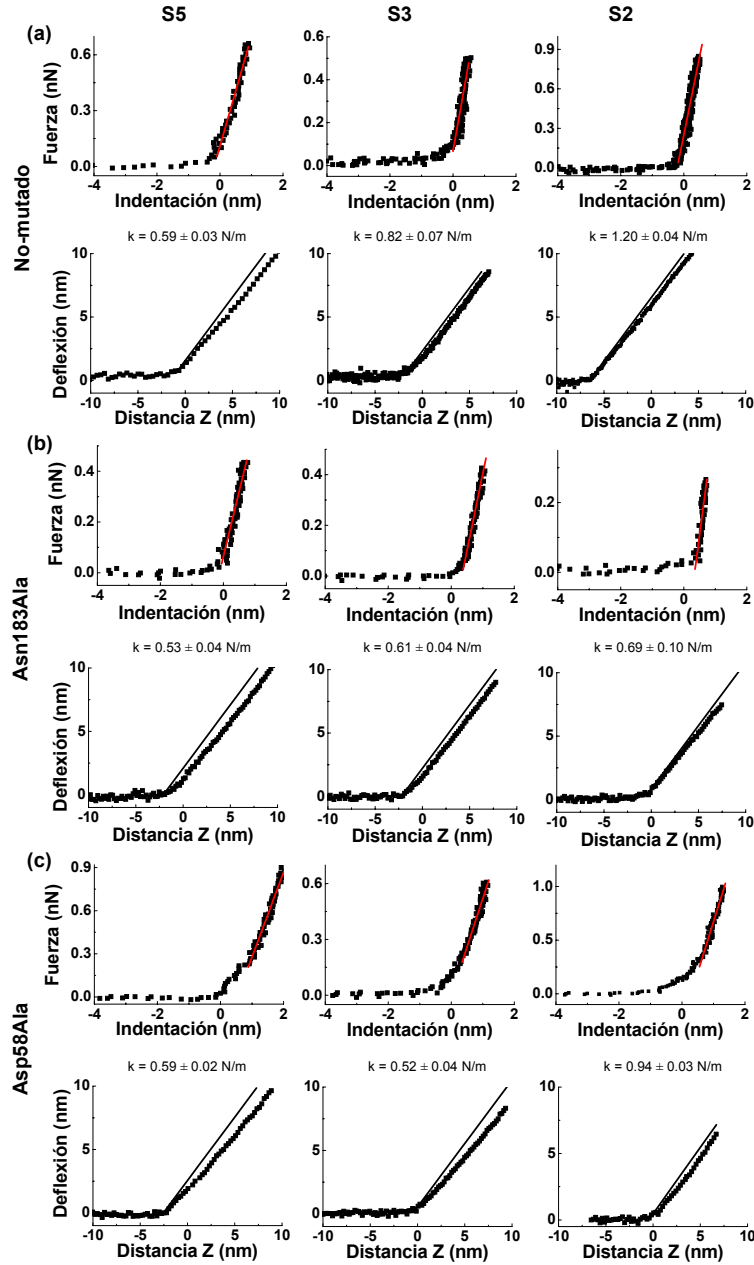
Simetría	Cápsidas vacías			Viriones		
	No mutada	N183A	D58A	No mutada	N183A	D58A
S5	9 (53)	5 (44)	5 (44)	14 (100)	8 (34)	6 (64)
S3	17 (100)	7 (59)	12 (100)	22 (110)	15 (79)	7 (66)
S2	7 (34)	6 (63)	5 (42)	11 (90)	12 (88)	5 (46)

**Tabla 5.1.** Número de cápsidas vacías y viriones analizados, para partículas sin mutar y mutadas (N183A y D58A). En paréntesis se muestra el número total de indentaciones realizadas a lo largo de los diferentes tipos de ejes de simetría (S5, S3, S2).

Las figuras 5.18 y 5.19 muestran ejemplos de curvas de deflexión y curvas de indentación promediadas para cápsidas vacías y viriones llenos del MVM respectivamente, cuando se les aplica una fuerza radial a lo largo de los tres tipos de ejes de simetría (S5, S3, S2), tanto para virus sin mutar como para virus con las mutaciones Asn183Ala y Asp58Ala. Nuevamente las cápsidas y viriones de virus sin mutar y virus mutados presentan una respuesta elástica lineal cuando son sometidos a una indentación del orden del espesor de la pared de la cápsida (~2 nm).



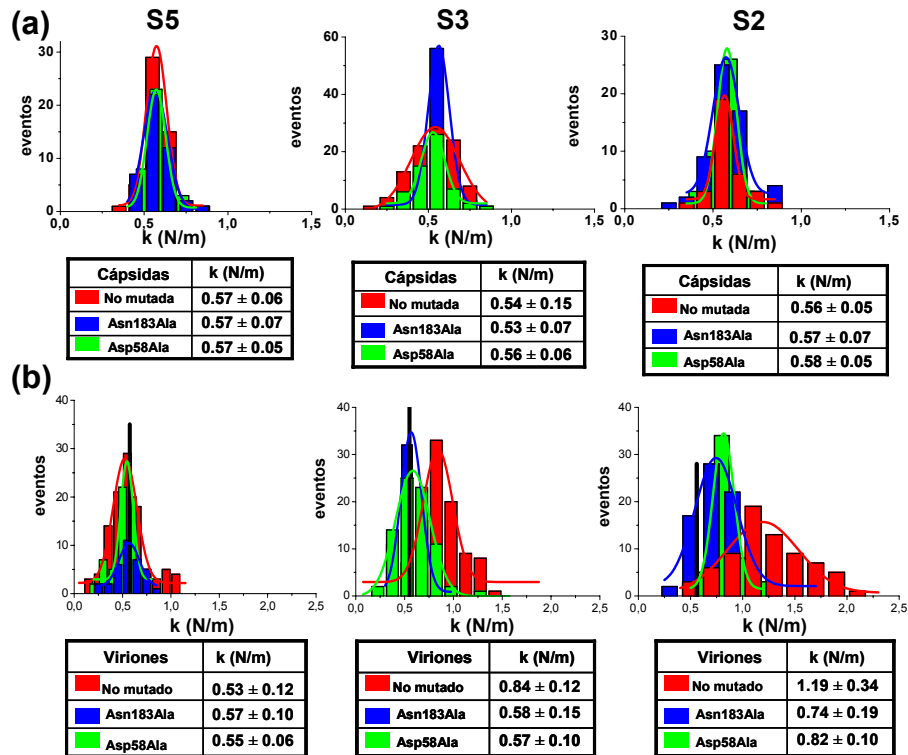
**Figura. 5.18.** Curvas de indentación promediadas y curvas de deflexión típicas para las cápsidas vacías: (a) no mutada, (b) mutada Asn183Ala y (c) mutada Asp58Ala, a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 respectivamente. Cada gráfica de indentación es el promedio de al menos cinco curvas y la línea roja muestra el ajuste lineal de las mismas. Las curvas de deflexión pertenecen a una de esas medidas, donde la línea negra corresponde a la curva de deflexión sobre una superficie de vidrio.



**Figura 5.19.** Curvas de indentación promediadas y curvas de deflexión típicas para los viriones llenos: (a) no mutado, (b) mutado Asn183Ala y (c) mutado Asp58Ala, a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 respectivamente. Cada gráfica de indentación es el promedio de al menos cinco curvas y la línea roja muestra el ajuste lineal de las mismas. Las curvas de deflexión pertenecen a una de esas medidas, donde la línea negra representa a la curva de deflexión sobre en una superficie de vidrio.

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

Las constantes elásticas de muelle obtenidas para las cápsida vacías para cada tipo de partícula (sin mutar y mutada) en los diferentes ejes de simetría están representadas en los histogramas de la figura 5.20.a. De igual forma, las constantes elásticas de muelle obtenidas para los viriones llenos de cada tipo de virus en las distintas orientaciones están representadas en los histogramas de la figura 5.20.b.



**Figura 5.20.** Comparación de las propiedades mecánicas de partículas del MVM no mutadas y mutadas. (a) Comparación de las propiedades mecánicas de cápsidas vacías del MVM no mutadas y mutadas. Los histogramas representan los valores de la constante elástica de muelle  $k$  obtenidos para cápsidas vacías individuales en los diferentes ejes de simetría: no mutada (rojo), mutada Asn183Ala (azul) y mutada Asp58Ala (verde). Las tablas asociadas a cada gráfica indican los valores promedios de  $k$  y las desviaciones estándares obtenidas de cada ajuste gaussiano para indentaciones a lo largo del eje de S5 (izquierda), S3 (centro) y S2 (derecha). (b) Comparación de las propiedades mecánicas de viriones llenos de ADN del MVM no mutados y mutados. Los histogramas y tablas correspondientes para los viriones están representados igual que en (a). La barra negra vertical en cada gráfica indica el valor de  $k$  para la cápsica vacía no mutada y es usada para facilitar la comparación entre los viriones y las cápsidas. Obsérvese que los valores obtenidos de  $k$  para las cápsidas vacías mutadas son indistinguibles de este valor. Un test de t-Student revela con una confianza  $>99\%$  que los valores medios de  $k$  obtenidos para los viriones no mutados y para cada uno de los viriones mutados a lo largo de los ejes de S2 y S3 no solapan.

Los ajustes gaussianos de cada histograma proporciona el valor de la constante elástica de muelle  $k$  para cada tipo de partícula cuando es medida a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 (Fig. 5. 20, ver los valores en las tablas de cada gráfica). De nuevo, las desviaciones más altas de los valores de  $k$  se obtienen para los viriones con respecto a las cápsidas vacías, especialmente a lo largo del eje S2. Suponiendo, nuevamente que las desviaciones se deban sólo al error experimental, las obtenidas para las cápsidas vacías y viriones deberían ser similares, al menos cuando se comparan valores similares de  $k$  promediados, como es el caso en los ejes de S3 y S5. Por lo que, las desviaciones más altas posiblemente reflejan una distribución gaussiana más ancha de los valores reales de elasticidad. Las causas de esto probablemente son las mismas que comentamos en el apartado 5.5.2. Ya que ahora sabemos que la dureza del virión sin mutar es anisótropa, la realización de indentaciones ligeramente fuera del eje de simetría sí que puede conducir a pequeñas diferencias en el valor de  $k$  obtenido en cada indentación. Este hecho, junto con la asimetría intrínseca del ADN, provoca una distribución gaussiana más ancha en los viriones en comparación con la distribución gaussiana de las cápsidas.

Para poder realizar un análisis comparativo entre los virus sin mutar y los virus mutados es importante establecer que la aproximación del valor de  $k$  cuantitativo para los virus sin mutar es reproducible en experimentos diferentes utilizando una nueva purificación del virus. La tabla 5.2 recoge los nuevos valores de  $k$  medidos en cápsidas vacías y viriones no mutados junto con los valores medidos anteriormente, los cuales pertenecen a experimentos diferentes. Se observa que volvemos a encontrar la anisotropía mecánica para el virión y que los nuevos valores medidos muestran un excelente acuerdo en los tres ejes de simetría con respecto a los valores antiguos.

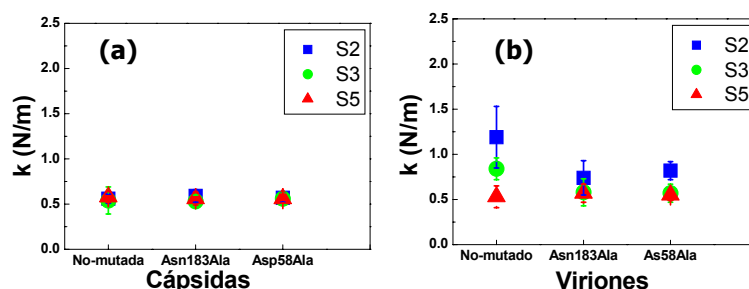
Simetría	Cápsida vacía		Virión	
	$k$ antiguo (N/m)	$k$ nuevo (N/m)	$k$ antiguo (N/m)	$k$ nuevo (N/m)
S5	$0.58 \pm 0.13$	$0.57 \pm 0.06$	$0.6 \pm 0.2$	$0.53 \pm 0.12$
S3	$0.56 \pm 0.15$	$0.54 \pm 0.15$	$0.8 \pm 0.4$	$0.84 \pm 0.12$
S2	$0.58 \pm 0.10$	$0.56 \pm 0.05$	$1.4 \pm 0.5$	$1.19 \pm 0.34$

**Tabla 5.2.** Constantes elásticas de muelle  $k$  obtenidas en experimentos independientes empleando preparaciones diferentes de las partículas MVM sin mutar. Los valores de “ $k$  antiguo” se corresponden con los valores medidos en el apartado anterior y los valores de “ $k$  nuevo” con los valores medidos de una nueva purificación de partículas víricas.

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

Esta reproducibilidad es observada también en aquellos casos donde hay una distribución gaussiana ancha, y por tanto, valida de forma experimental cualquier diferencia estadísticamente significativa que pueda ser obtenida cuando se comparan la dureza de diferentes partículas bajo las mismas condiciones experimentales.

Cuando comparamos la dureza de los virus mutados frente a la de los no mutados, cualquier diferencia encontrada en los viriones mutados con respecto a los viriones no mutados puede ser debida, en principio, a la eliminación de las interacciones entre los grupos truncados y otros residuos de la cápsida y/o los segmentos del ADN unido a la cápsida. La cápsida vacía y el virión del MVM son estructuralmente casi indistinguibles a resolución atómica [Kontou 2005], por lo que si alguna mutación afecta a la dureza del virión mediante la rotura o eliminación de interacciones intracápsidas, la dureza de la cápsida vacía también debería quedar afectada. Si analizamos las indentaciones realizadas sobre las cápsidas vacías individuales sin mutaciones y con mutaciones (Fig. 5.20.a), encontramos que los ajustes gaussianos de los histogramas proporcionan valores de la constante elástica de muelle  $k$  a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 que son comparables entre sí, es decir, las cápsidas mutadas presentan un comportamiento mecánico isótropo. Cuando las dos cápsidas vacías mutadas son comparadas con la cápsida vacía no mutada, los valores de  $k$  para cualquier eje de simetría son también indistinguibles (Fig. 5.21.a).

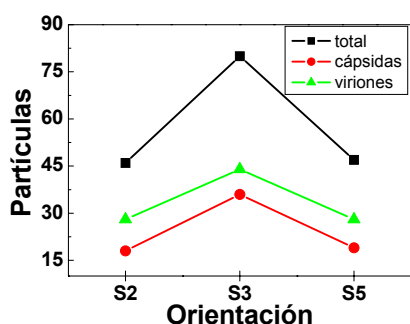


**Figura 5.21.** Gráficas comparativas de la constante elástica de muelle  $k$  para cápsidas vacías (a) y viriones llenos (b), del virus sin mutar y de los dos virus mutados Asn183Ala y Asp58Ala. En cada gráfica se muestra el valor promedio de  $k$  proporcionado por el ajuste gaussiano de los correspondientes histogramas junto con las desviaciones estándares para los ejes de S2 (cuadrado azul), S3 (círculo verde) y S5 (triángulo rojo).

Para confirmar que el número de medidas adquiridas es suficientemente alto como para obtener el valor de  $k$  mediante un ajuste gaussiano de los datos, realizamos más curvas de indentación sobre un gran número de las cápsidas mutadas Asp183Ala



orientadas a lo largo del eje de S3. En estas medidas no encontramos diferencias significativas en el valor de  $k$  proporcionado por el ajuste gaussiano del histograma o en la distribución gaussiana de las medidas individuales. Estos resultados indican que cualquier efecto de las mutaciones en la dureza del virión del MVM será debido a la eliminación de las interacciones entre el ADN y la cápsida y no a la eliminación de interacciones intracápsidas. A pesar de que la densidad de viriones sin mutar y mutados siempre fue inferior a la de las cápsidas (Fig. 5.16), realizamos una mayor búsqueda de viriones para efectuar un gran número de curvas de indentación y poder extraer unas conclusiones más firmes y certeras. Observamos que el eje de S3 es la orientación preferida de todas las partículas, tanto para cápsidas como para viriones, probablemente ésta sea la posición más estable de las tres (Fig. 5.22).

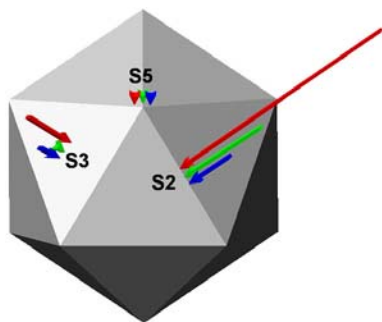


**Figura 5.22.** Gráfica comparativa del número total de cápsidas (círculo rojo), viriones (triángulo verde), y suma de ambos (cuadrado negro), de las partículas sin mutar y mutadas, visualizadas en las imágenes de AFM orientadas a lo largo de los ejes de S2, S3 y S5. Nótese que el mayor número de partículas se encuentran orientadas en el eje de S3.

Cuando analizamos las indentaciones realizadas en viriones llenos de ADN sin mutaciones y con mutaciones (Fig. 5.20.b) observamos que la introducción de las mutaciones reduce sustancialmente el valor de  $k$  encontrado para el virión no mutado a lo largo de los ejes de S3 y especialmente para los ejes de S2 (Fig. 5.21.b). La reducción de los valores de  $k$  de los viriones mutados no puede ser debida a un cambio de la carga electrostática superficial de la partícula, ya que las mutaciones sólo eliminan grupos neutros de los residuos internos de la cápsida sin afectar a ninguno de los grupos con carga de la misma o del ADN, los cuales permanecen sin modificar. La aplicación de un test de t-Student a los histogramas de la figura 5.20.b nos indica con una confianza del 99% que los valores promedio de  $k$  obtenidos a lo largo del eje de S2 para los viriones mutados y para el virión no mutado son significativamente diferentes. Podemos afirmar que la presencia del ADN en la partícula no mutada provoca un aumento de la dureza del 55% y 113% a lo largo de los ejes de S3 y S2

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

respectivamente, mientras que la introducción de las mutaciones N183A y D58A reducen estos valores a un 31% y 38%, y a un 32% y 31%, respectivamente (Fig. 5.23).



**Figura. 5.23.** Representación esquemática del aumento de la dureza del virión lleno de ADN relativo a la cápsida vacía, a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 para el MVM no mutado (flechas rojas), el mutado N183A (flechas azules) y el mutado D58A (flechas verdes). La longitud de las flechas es proporcional a  $\Delta k$ , es decir, a la diferencia encontrada en el valor de  $k$  entre el virión y la cápsida vacía. Si  $\Delta k$  no es significativamente diferente de cero, según un test de t-Student, el aumento de la dureza se representa con una cabeza de flecha.

Podemos concluir que la eliminación de las mayores interacciones no covalentes entre los residuos específicos de ciertos aminoácidos localizados en la pared interna de la cápsida del MVM y los parches de unión ADN-cápsida, producen una reducción sustancial en el reforzamiento mecánico mediante el ADN de la partícula vírica. Este resultado confirma experimentalmente las predicciones teóricas del modelo de elementos finitos y muestran que las interacciones específicas entre la cápsida y los segmentos de ADN son las responsables directas del reforzamiento mecánico observado en el virión sin mutar. En los viriones mutados Asn183Ala y Asp58Ala, la ausencia de algunas de las mayores interacciones ADN-cápsida pueden causar que los segmentos de ADN queden débilmente unidos a las zonas específicas de la pared interna de la cápsida, reduciendo así su efecto de reforzamiento. En cada partícula mutada, sólo algunas de las mayores interacciones entre la cápsida y el ADN son suprimidas y consecuentemente, el efecto de reforzamiento del ADN no es completamente eliminado. Sin embargo, la dureza del virión N183A se reduce hasta el punto de hacerlo estadísticamente indistinguible de la cápsida vacía. La dureza del virión D58A es también sustancialmente reducida, aunque ésta es todavía significativamente superior a la de la cápsida, según un test de t-Student con una confianza del 99%. La pérdida de efectos de cooperatividad entre las diferentes interacciones intermoleculares en cada zona de unión equivalente ADN-cápsida podría explicar este resultado.

### 5.6.3. Implicación de las mutaciones en las propiedades mecánicas de los virus

Las causas físico-químicas de un reforzamiento mecánico mediante el ácido nucleico pueden depender del virus y del ácido nucleico involucrado. Un modelo analítico desarrollado recientemente indica que el reforzamiento mecánico del fago  $\lambda$  mediante una molécula de ADN de cadena doble es debido a la presión osmótica generada por el ADN hidratado con moléculas de agua [Ivanovska 2007]. En el MVM la molécula de ADN de cadena simple está densamente empaquetada en su interior, pero no se ha comprobado aún la presencia de una presión interna sustancial. Sin embargo, cuando la interacción entre los segmentos del ADN unido y la cápsida del MVM son debilitados a través de las mutaciones, la dureza del virión queda reducida a un valor similar al de la cápsida vacía, a pesar de que la molécula de ADN está todavía en el interior del virus. Por lo que la molécula de ADN dentro del virus no genera ninguna presión interna sustancial. Alternativamente, si el ADN provocase una presión interna en el MVM, ésta no contribuiría significativamente a la dureza mecánica del virus.

Si relacionamos los efectos mecánicos observados con la biología del MVM podemos señalar que los residuos de la cápsida involucrados en las interacciones con el ADN, incluyendo los estudiados aquí N183 y D58, contribuyen a la estabilidad del virión frente a la inactivación térmica y a la infectividad del virus, la cual puede ser reducida más de 10 veces [Reguera 2005]. Por otra parte, sabemos que cada zona visible de ADN se une a la pared interna penetrando y rellenando una concavidad y estableciendo múltiples interacciones con los residuos de tres proteínas vecinas, contribuyendo así a formar parte de la estructura de ellas. Por lo que, una posibilidad es que el ADN unido a esta zona sirva para reforzar la cápsida mecánica y térmicamente, permitiendo a los viriones extracelulares ser infecciosos hasta que alcancen a las células huéspedes. Otra posibilidad, no exclusiva, es que las zonas de unión de ADN puedan tener un papel estructural para mantener la cápsida en una conformación mecánicamente más estable y prevenirla de sufrir cambios conformacionales no productivos durante el ciclo de infección. Por ejemplo, en el *bean pod mottle virus* (BPMV) la presencia de material genético, ARN de cadena simple, estabiliza la cápsida frente a la desnaturalización térmica [Da Poian 2002].

## 5. Propiedades mecánicas de cápsidas víricas

---

Desde un punto de vista nanobiotecnológico, estos resultados demuestran que las propiedades mecánicas de un complejo biomolecular pueden ser manipuladas racionalmente usando ingeniería de proteínas. Mediante mutagénesis dirigida hemos obtenido una partícula vírica modificada, que es mecánicamente más blanda que el virus natural. La ingeniería de proteínas puede ser utilizada para modificar las propiedades mecánicas de nanopartículas constituidas de proteínas.

### 5.7. RESUMEN

Los virus son parásitos intracelulares submicroscópicos, compuestos por ARN o ADN y una capa protectora formada por proteínas, denominada cápsida. Las proteínas de la cápsida se autoensamblan dando origen a los capsómeros, los cuales pueden estar formados por agrupaciones de 5 proteínas (pentámeros) o de 6 proteínas (hexámeros). La partícula viral completa se denomina virión. El tamaño y forma de los virus es muy variable. Muchos de ellos presentan una morfología icosaédrica, cuya arquitectura se rige por el principio de cuasiequivalencia de Caspar y Klug. A lo largo de todo el ciclo biológico, los virus deben tolerar y resistir un amplio rango de condiciones extremas para su supervivencia, por lo que estos nanocontenedores de material genético han evolucionado hasta alcanzar un diseño con propiedades físicas muy singulares.

El empleo del AFM en el campo de la biología permite visualizar estas estructuras nanométricas en condiciones fisiológicas con alta resolución y estudiar sus propiedades mecánicas. La cápsida icosaédrica del bacteriófago T7 ha sido resuelta en medio líquido, en la que hemos visualizado los pentámeros en uno de los ejes de S5 y observado un comportamiento mecánico diferente entre los pentámeros y el resto de la cápsida. Hemos estudiado las propiedades mecánicas del virus diminuto del ratón (MVM), que es uno de los virus más pequeños que se conocen ya que está formado por sólo 60 proteínas estructuralmente equivalentes ( $T = 1$ ). Hemos realizado curvas de indentación sobre cápsidas vacías y viriones llenos de material genético (ADN de cadena simple). La visualización de las características topográficas, específicas para cada orientación de la partícula, en las imágenes de AFM nos ha permitido comparar las propiedades mecánicas de cápsidas y viriones en función de los tres tipos de ejes de simetría. Hemos encontrado que la cápsida vacía de ADN presenta un comportamiento mecánico isótropo, mientras que la presencia de ADN dentro del virión conduce a un

reforzamiento anisótropo de la dureza del virus de un 3%, 40% y 140% a lo largo de los ejes de S5, S3 y S2 respectivamente. La realización de un modelo de elementos finitos del virus indica que este reforzamiento mecánico anisótropo es debido a las extensiones del ADN, cristalográficamente visualizadas, unidas a 60 concavidades localizadas simétricamente en el interior de la cápsida. Estos resultados, junto con algunas evidencias biológicas sobre la existencia de ciertos cambios conformacionales en los poros localizados en los ejes de S5, sugieren que el virus puede haber adoptado este comportamiento anisótropo para reforzar la dureza global de la partícula vírica pero sin cancelar los cambios conformacionales necesarios para su infectividad.

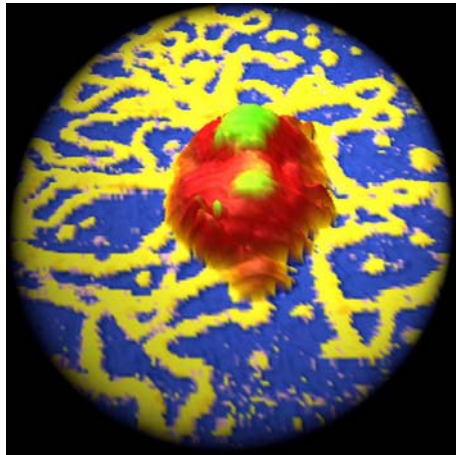
También hemos comprobado experimentalmente la predicción del modelo de elementos finitos mediante ingeniería de proteínas. Hemos truncado residuos de aminoácidos seleccionados específicamente para eliminar las mayores interacciones entre la cápsida y las zonas de unión del ADN. Mediante el empleo del AFM, hemos medido el efecto de estas mutaciones en la dureza de las partículas víricas. Observamos que las mutaciones no afectan a la dureza de la cápsida vacía pero sin embargo, sí reducen significativamente la diferencia de dureza entre el virión lleno de ADN y la cápsida vacía. Los resultados encontrados indican por un lado, que las interacciones intermoleculares entre grupos químicos individuales contribuyen a las propiedades mecánicas de un complejo supramolecular y por otro lado, que las interacciones específicas entre proteínas y ADN son el origen del incremento anisótropo de la rigidez de un virus. Este estudio también demuestra, por primera vez, que es posible controlar las propiedades mecánicas de una nanopartícula ensamblada de proteínas por manipulación racional mediante ingeniería de proteínas basada en un modelo mecánico previo.

El MVM y otros parvovirus pueden haber evolucionado hasta conseguir una interacción múltiple, funcionalmente compatible, entre el material genético y la pared interna de la cápsida, para mejorar su estabilidad térmica y mecánica, contribuyendo así al éxito biológico de estos virus. Estas estrategias podrían ser imitadas para diseñar y sintetizar nuevas nanoestructuras con diversas funcionalidades, a partir de las cuales poder fabricar materiales bio-inspirados y fármacos, donde se pueden utilizar incluso las propias partículas víricas como punto de partida o en alguna fase de la cadena de producción.



## **CAPÍTULO 6:**

### **ACCIÓN DE LAS FUERZAS CAPILARES EN CÁPSIDAS VÍRICAS.**



*“Usa el método científico: probando varias veces, llegarás a la verdad”, Cicerón*





## **6. ACCIÓN DE LAS FUERZAS CAPILARES EN CÁPSIDAS VÍRICAS**

A lo largo del ciclo biológico de un virus algunas de las etapas ocurren en el medio extracelular, donde los viriones deben vencer una gran variedad de condiciones fisicoquímicas, que eventualmente pueden incluir un proceso de secado. Poco es conocido sobre los efectos estructurales y funcionales causados por el proceso de desecación o sobre las estrategias que pueden adoptar algunos virus cuando se encuentran sometidos a un ambiente relativamente seco, como la propagación a través del aire. El conocimiento de los efectos de la desecación en partículas víricas puede permitir el desarrollo de procesos eficientes para preparar muestras de virus deshidratados y activos biológicamente con fines biomédicos. Nosotros vamos a estudiar el efecto provocado por las fuerzas capilares en la integridad estructural durante el proceso de desecación para dos virus geoméricamente diferentes.

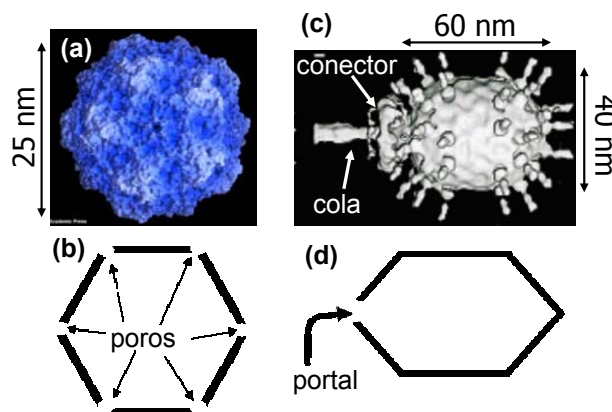
La acción de las fuerzas capilares creada por un menisco de agua es muy importante en los procesos de hidratación-deshidratación que tienen lugar en la interfase líquido-gas. Además, los meniscos de agua en la nanoescala tienen un papel importante en muchos fenómenos, como por ejemplo en las fuerzas de hidratación en biología y en el estudio de los coloides [Israelachvili 1996; Martin 2007]. La forma de los meniscos de agua así como las fuerzas que éstos ejercen han sido estudiadas en una amplia variedad de geometrías, por ejemplo en micro y nanocanales [Gau 1999; Sbragaglia 2006] y en sistemas de superficie-nanoesfera [Major 2006; Sprakel 2007]. Todos estos sistemas consisten en geometrías abiertas donde el agua está confinada entre dos superficies. En nuestros experimentos, vamos a identificar las fuerzas capilares ejercidas por los meniscos de agua en una geometría cerrada, como son las partículas víricas, donde el agua queda confinada en estas nanocavidades durante las últimas etapas del proceso de desecación.

### 6.1. MODELOS DE CÁPSIDAS VÍRICAS

Los virus utilizados representan dos modelos muy diferentes desde el punto de vista estructural y geométrico: el bacteriófago  $\Phi 29$  y el virus diminuto del ratón (MVM).

El MVM está formado por 60 proteínas estructuralmente equivalentes que se ensamblan para originar una cápsida icosaédrica con número de triangulación  $T = 1$  y diámetro de 25 nm [Tsao 1991] (Fig. 6.1.a). En cada uno de los 12 vértices de la cápsida icosaédrica hay un poro que podría ser usado para el proceso de translocación del material genético vírico, ADN de cadena simple (Fig. 6.1.b). Los datos de rayos-X revelan que la estructura atómica de la cápsida vacía y del virión lleno de ADN son similares [Agbandje-McKenna 1998; Kontou 2005].

El bacteriófago  $\Phi 29$  infecta a la bacteria *Bacillus subtilis*. Los datos de criomicroscopía electrónica revelan que la cápsida tiene una geometría de icosaedro prolado formado por un anillo de 10 hexámeros insertados entre las dos semiesferas del icosaedro, con un número de triangulación  $T = 3$  [Tao 1998; Ibarra 2000; Morais 2005] (Fig. 6.1.c). La cápsida está formada por 235 subunidades de un sólo tipo de proteína estructural (gp8) y fibras alrededor de la cápsida (gp8.5). Para su ensamblaje requiere de la presencia de un conector (gp10) y de proteínas de andamiaje (gp7) [Tao 1998; Simpson 2000; Morais 2003; Morais 2005]. Las proteínas gp8 están organizadas para formar en total 11 pentámeros y 30 hexámeros, según la organización de cuasiequivalencia de Caspar y Klug [Caspar 1962]. Uno de los pentámeros, localizado en alguno de los dos extremos de la cápsida prolada, es reemplazado por el complejo del conector (Fig. 6.1.d). El material genético vírico, ADN de cadena doble, se empaqueta a través del conector en el interior de la procápsida, empleando para ello la ayuda de un motor molecular, la proteína ATPasa gp16 [Ibarra 2000; Simpson 2000; Guasch 2002]. La larga molécula de ADN, 19.3 kb (6.6  $\mu\text{m}$ ) se encuentra acomodada a alta presión ( $\sim 60$  atm) dentro de la cápsida [Smith 2001]. El resultado final de este proceso es el virus infeccioso o virión, en el que la cápsida madura tiene unas dimensiones correspondientes a 54 nm de longitud, 42 nm de anchura y 1.6 nm de espesor de la pared y donde el conector se encuentra unido a una cola [Tao 1998; Ibarra 2000; Guasch 2002]. No se observan cambios en el volumen de la cápsida durante la maduración presentando la procápsida y la cápsida madura las mismas dimensiones.



**Figura 6.1.** Representación de dos modelos de cápsidas víricas. MVM: (a) reconstrucción atómica vista a lo largo del eje de simetría 5; (b) corte transversal de un dibujo esquemático de la geometría de la cápsida y de la posición de los poros localizados en los 12 vértices del icosaedro.  $\Phi 29$ : (c) reconstrucción pseudoatómica [Tao 1998], donde se observa la estructura prolada de la cápsida, las fibras alrededor de ésta, el conector y la cola; (d) corte transversal de un dibujo esquemático de la geometría de la cápsida y de la posición del portal en uno de sus extremos.

## 6.2. EFECTOS DE LA DESECACIÓN

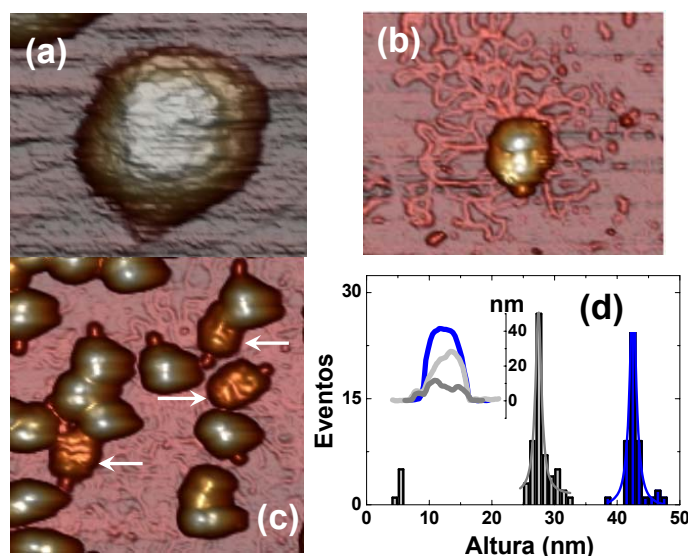
Mediante el AFM vamos a investigar los cambios estructurales provocados por el proceso de desecación en viriones llenos de ADN y en cápsidas vacías, tanto para el fago  $\Phi 29$  como para el virus MVM. Las partículas víricas son visualizadas tanto en medio líquido con JM como en aire después del proceso de desecación con AM-DAFM utilizando micropalancas de constantes de muelle de 0.05 N/m y 0.73 N/m respectivamente. Respecto a la preparación de las muestras en aire, las partículas son adsorbidas sobre mica y posteriormente la superficie es lavada con agua destilada para eliminar restos de las sales del medio fisiológico. Por último, las superficies se secan con nitrógeno gas (apéndice I).

### 6.2.1. Cápsidas llenas de material genético

Empezamos analizando el comportamiento del fago  $\Phi 29$ . Visualizamos el virión maduro en condiciones fisiológicas con el fin de comprobar su integridad estructural (Fig. 6.2.a). En estas condiciones las dimensiones de la partícula del  $\Phi 29$  se corresponden con las nominales [Tao 1998], es decir, 54 nm de longitud y 42 nm de anchura (perfil azul en la figura 6.2.d). Además, la cola es claramente resuelta en uno de los extremos de la cápsida. Cuando el virión  $\Phi 29$  se deshidrata al eliminar el líquido fisiológico de la muestra, las imágenes de AFM nos muestran partículas como las

## 6. Acción de las fuerzas capilares en cápsidas víricas

observadas en la figura 6.2.b. Las medidas detalladas sobre la longitud del ADN visualizado en las imágenes indican que aproximadamente el 55% del ADN vírico es expulsado desde el interior del virus. Si realizamos un perfil topográfico sobre la partícula, podemos comprobar que la altura de ésta en aire ha decrecido 15 nm con respecto a cuando se encuentra en líquidos (perfil gris claro en la figura 6.2.d). Después del proceso de desecación, la mayoría de los viriones visualizados exhiben una topografía similar a la mostrada en la figura 6.2.b, donde cada virión presenta una depresión en la zona ecuatorial (Fig. 6.2.b, 6.2.c y perfil gris claro en la figura 6.2.d) y la superficie se encuentra cubierta por el ADN expulsado de los virus. Si observamos con detenimiento las imágenes de AFM obtenidas, podemos distinguir algunos virus (marcados por flechas en la figura 6.2.c) que presentan alturas alrededor de 5 nm (perfil gris oscuro en la figura 6.2.d). Es muy probable que estas partículas hayan expulsado completamente su material genético, ya que la altura encontrada coincide con el doble del espesor de la pared del fago  $\Phi 29$  [Tao 1998; Ibarra 2000].

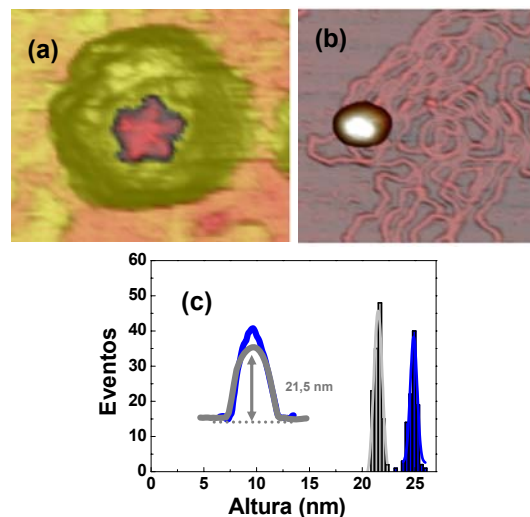


**Figura 6.2.** Cambios estructurales provocados por el proceso de desecación en viriones del fago  $\Phi 29$  observados en imágenes de AFM. (a) Virión individual en condiciones fisiológicas. Se distingue la cola en uno de los extremos de la partícula. (b) Virión individual después del proceso de desecación. Alrededor del 55% del ADN vírico es expulsado al exterior. (c) Varios viriones después de la desecación. La gran mayoría de ellos muestran alturas de ~27 nm, excepto algunos (marcados con flechas) que colapsan pared con pared y alcanzan alturas de 5 nm. (d) Histogramas de alturas de los viriones en líquidos (azul) y en aire después de la desecación (gris). La gráfica muestra la comparación de los tres perfiles topográficos encontrados.

## 6. Acción de las fuerzas capilares en cápsidas víricas

Si realizamos un histograma de alturas de los viriones en medio líquido y en aire después de la desecación, obtenemos una distribución discreta de las alturas (Fig. 6.2.d), en la que la altura de los viriones en aire después de la desecación disminuye un 60% o un 10% con respecto a la altura en líquidos. En el último caso, los viriones presentan una altura máxima de 5 nm, implicando que colapsan pared con pared. Estos resultados indican que la altura del virión colapsado está correlacionada con la cantidad de ADN que permanece en el interior de la cápsida después del proceso de desecación. Para comprobar que los efectos observados son debidos exclusivamente a la desecación y no a variaciones de pH o fuerza iónica del cambio desde el medio fisiológico al agua destilada, las partículas son también visualizadas en agua destilada. En este caso, no encontramos ninguna evidencia de la expulsión del ADN ni diferencias relevantes en la estructura de los virus relativas a cuando éstos están en condiciones fisiológicas.

Procediendo de la misma forma, visualizamos el virión del MVM bajo condiciones fisiológicas resolviendo claramente las características topográficas de la partícula alrededor de uno de los ejes de simetría 5 (Fig. 6.3.a). La altura de esta partícula (~24 nm) se corresponde con el diámetro nominal de la misma [Agbandje-McKenna 1998].



**Figura 6.3.** Cambios estructurales provocados por el proceso de desecación en viriones del MVM observados en imágenes de AFM. (a) Virión individual en condiciones fisiológicas. Se resuelven las características topográficas alrededor del eje de simetría 5. (b) Virión individual después de la desecación, con el ADN vírico expulsado sobre la superficie. (c) Histogramas de alturas de los viriones en líquidos (azul) y en aire después de la desecación (gris). La gráfica muestra una comparación de los perfiles topográficos observados.

Después del proceso de desecación, la partícula también expulsa el material genético quedando extendido alrededor de la partícula sobre la superficie (Fig. 6.3.b). Pero esto no implica efectos sustanciales en la integridad estructural de la cápsida, la cual conserva prácticamente su tamaño y forma original. Si realizamos los correspondientes histogramas de alturas de los viriones en líquido y en aire observamos que la altura de los viriones en aire después de la desecación es ~90% de la altura que presentan en líquido (Fig. 6.3.c) Esta diferencia es muy pequeña comparada con la encontrada para los fagos  $\Phi$  29, indicando que el virión del MVM no colapsa cuando se deshidrata.

Nuevamente, como control, los viriones son visualizados en agua destilada después de la eliminación de su medio fisiológico. En este caso, tampoco encontramos expulsión del ADN o alguna diferencia relevante entre la estructura de los virus en condiciones fisiológicas y en agua destilada.

### 6.2.2. Cápsidas vacías de material genético

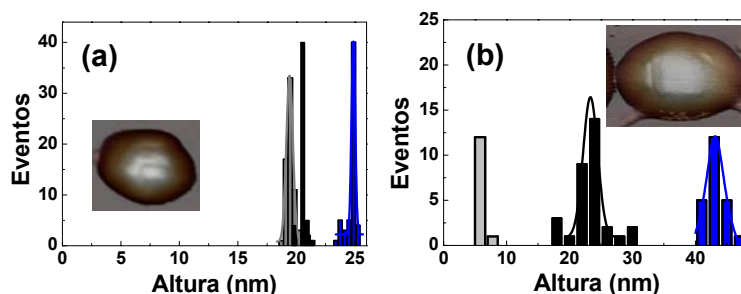
Para investigar el papel que juega el ADN en los efectos observados durante el proceso de desecación, realizamos experimentos similares a los anteriores, pero con cápsidas vacías, es decir, sin material genético. Otros resultados previos, muestran que la expulsión del material genético en condiciones fisiológicas no induce ningún colapso de las partículas en el rinovirus humano [Kienberger 2004].

Las cápsidas vacías del MVM son visualizadas en líquido y posteriormente en aire después de la desecación. Si realizamos un histograma de alturas para ambos casos, observamos que la cápsida vacía en aire presenta prácticamente la misma altura que cuando es visualizada en líquidos (Fig. 6.4.a, histogramas azul y gris para las alturas en líquidos y en aire respectivamente).

En contraste, todas las cápsidas vacías del  $\Phi$ 29 colapsan cuando pasan del medio líquido al aire. Los histogramas de alturas de ambos casos muestran una altura promedio de 6 nm, es decir, la altura ahora es tan solo un 10% de la altura que presentan en medio líquido (Fig. 6.4.b, histogramas azul y gris para las alturas en líquidos y en aire respectivamente).

Mientras que el comportamiento del MVM, tanto de las cápsidas vacías como de los viriones llenos de ADN, en el proceso de desecación es similar, la cantidad de partículas del  $\Phi$ 29 colapsadas pared con pared aumenta desde un 10% para el caso de

los viriones llenos a un 100% para el de las cápsidas vacías. Esto indica que la presencia del ADN dentro de la cápsida del  $\Phi 29$  contribuye a prevenir el colapso total de la cápsida proteica en el proceso de desecación.

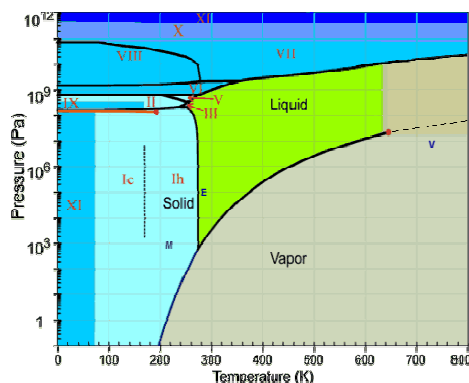


**Figura 6.4.** Cambios estructurales provocados por la desecación en cápsidas vacías observados en imágenes de AFM. (a) Histogramas de alturas de cápsidas vacías del MVM en medio líquido (azul), en aire después de la desecación (gris) y en aire después de la liofilización (negro). (b) Histogramas de alturas de cápsidas vacías del  $\Phi 29$  con el mismo código de colores que los histogramas en (a). Las imágenes de AFM en (a) y (b) corresponden a cápsidas vacías del MVM y del  $\Phi 29$  después de la liofilización respectivamente.

Las fuerzas capilares podrían jugar un papel importante en los efectos estructurales observados. Durante el proceso de desecación el agua puede formar un menisco interno dentro de las partículas víricas y otro menisco externo alrededor de las mismas. Esto induciría la aparición de ciertas fuerzas capilares provocadas por los propios meniscos líquidos, las cuales pueden adquirir valores en el rango de las decenas de nN [Maeda 2003]. Estos valores de fuerza podrían ser suficientes para deformar y romper una partícula vírica [Klug 2006]. Para comprobar de forma experimental el posible papel que estas fuerzas puedan ejercer en la estructura de las cápsidas, las partículas víricas van a ser deshidratadas mediante un proceso de liofilización. La liofilización involucra principalmente dos etapas, la congelación del agua a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el secado por sublimación de la muestra congelada a muy baja presión. De esta forma, la sublimación del agua desde sólido a gas va a prevenir la formación de cualquier menisco líquido en la cápsida, evitando la generación de fuerzas capilares en el virus. El proceso de liofilización fue realizado en una cámara de alto vacío, dentro de la cual es posible controlar la temperatura y la presión. Depositamos  $20\text{ }\mu\text{l}$  de la muestra con las partículas víricas sobre mica y una vez que éstas son adsorbidas en la superficie, la muestra se lava con agua destilada, se congela con nitrógeno líquido a una temperatura por debajo de  $193\text{ K}$  ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y se mantiene dentro de la cámara a una

## 6. Acción de las fuerzas capilares en cápsidas víricas

presión de  $2 \times 10^{-2}$  Pa ( $2 \times 10^{-4}$  mbar) (Fig. 6.5). Bajo estas condiciones, después de aproximadamente 30 minutos, el agua sólida sublimó a gas, siendo la temperatura final de 253 K (-20 °C) y la presión final de  $5 \times 10^{-3}$  Pa ( $5 \times 10^{-5}$  mbar).



**Figura 6.5.** Diagrama de fases del agua: vapor (gris), líquido (verde), sólido (azul), junto con todas las diferentes fases del hielo sólido. El punto triple del agua (donde coexisten los tres estados) tiene lugar a una temperatura de 273,16 K (0,01 °C) y a una presión de 611,73 Pa. Para pasar de la fase sólida a la fase vapor, debemos trabajar a una presión y temperatura por debajo del punto triple.

Las cápsidas vacías y viriones llenos del  $\Phi 29$  y del MVM son sometidas al proceso de liofilización descrito arriba. Después las partículas de ambos virus son visualizadas con el AFM para observar los cambios estructurales inducidos en este proceso. Encontramos una característica común entre los dos tipos de viriones después de la liofilización: el ADN sigue siendo expulsado por los virus en ambos casos. Por otra parte, los histogramas de alturas de ambas cápsidas vacías después de la liofilización representados en las figuras 6.4.a y 6.4.b para el MVM y el  $\Phi 29$  (color negro) respectivamente, muestran los efectos de la liofilización en la estructura de las cápsidas vacías. Observamos que la liofilización previene el colapso pared con pared de las cápsidas vacías del  $\Phi 29$ , mientras que las cápsidas vacías del MVM presentan una altura ligeramente superior con respecto a cuando se les somete a la desecación.

En la tabla 6.1 se resumen los resultados experimentales encontrados sobre los cambios estructurales de las cápsidas vacías y viriones llenos del  $\Phi 29$  y del MVM en medio líquido, en aire después de la desecación y en aire después de la liofilización.



## 6. Acción de las fuerzas capilares en cápsidas víricas

altura (nm) condiciones muestra	Φ29				MVM			
	lleno	% nominal	vacío	% nominal	lleno	% nominal	vacío	% nominal
<b>líquido</b>	42 ± 1	100%	43 ± 4	100%	25 ± 1	100%	25 ± 1	100%
<b>aire</b> (después de la dsecación)	27 ± 1 (90% población)	36%	6 ± 2	13%	22 ± 1	87%	20,0 ± 0,5	78%
	6 ± 1 (10% población)	13%						
<b>aire</b> (después de la líoilización)	28 ± 1	36%	23 ± 3	54%	22 ± 1	87%	21 ± 1	82%

**Tabla 6.1.** Resumen de los resultados experimentales para el fago Φ29 y para el virus MVM. Los porcentajes de altura indicados están referidos al valor de la altura del virus en líquido.

### 6.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para poder interpretar los resultados experimentales expuestos anteriormente hay que considerar varios aspectos importantes sobre cómo estos dos virus empaquetan y expulsan su material genético así como sus diferencias estructurales y geométricas.

#### 6.3.1. Expulsión del material genético

En el caso del fago Φ29, hay tener en cuenta que el proceso de empaquetamiento del ADN ocurre a través del conector situado en uno de los extremos de la cápsida [Carrascosa 1999] (Fig. 6.1.c y 6.1.d) y que durante las primeras etapas de empaquetamiento del ADN se acumula energía elástica dentro del virus generando una presión interna de ~60 atm [Smith 2001], la cual es probablemente utilizada para inyectar el ADN vírico dentro de la bacteria huésped [Gonzalez-Huici 2004]. El análisis de la estructura del conector antes y después del empaquetamiento del ADN muestra una diferencia conformacional, principalmente debida al cierre del canal en la intercara entre el conector y las proteínas superiores de la cola (p11) cuando es el ADN es encapsulado [Carrascosa 1999]. Este cierre está probablemente implicado en la conservación del ADN dentro de la cápsida. La liberación del ADN puede requerir un cambio conformacional de esta región para que el canal pueda abrirse nuevamente. Debido al papel crucial del agua en la estabilización de la conformación nativa de las proteínas, la desecación del virus podría también provocar un cambio estructural, quizás a través de una reorganización conformacional de algunos de los componentes del conector y/o de la cola [Carrascosa 1999]. De esta forma, una vez que el canal esté

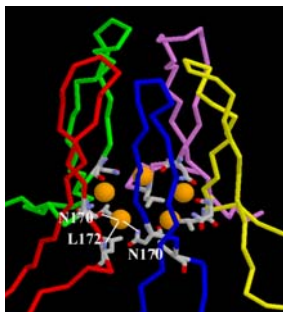
## 6. Acción de las fuerzas capilares en cápsidas víricas

---

abierto, la presión interna dentro del virus podría ayudar a expulsar el ADN desde el interior de la cápsida. Sin embargo, este proceso de expulsión ocurre de forma diferente al proceso de empaquetamiento. Mientras que la encapsulación del ADN es dependiente de la hidrólisis del ATP, su expulsión no requiere un aporte de energía adicional [Gonzalez-Huici 2004]. La longitud del ADN fuera del virus observada sobre la superficie puede ser medida en las imágenes de AFM (Fig.6.2.b), resultando en un valor del 55% de la longitud total de la cadena de ADN. Este valor es muy cercano al 65% de la longitud del ADN encontrada en la primera etapa de expulsión o *push* del proceso de translocación [Gonzalez-Huici 2006]. Esto sugiere que la expulsión del ADN, inducida por el proceso de desecación, podría ser similar al primer paso independiente de energía de la inyección fisiológica del ADN vírico del fago  $\Phi 29$  dentro de la bacteria huésped, siendo ambas expulsiones causadas por la apertura del conector y la energía elástica del ADN almacenada en el interior del virus [Purohit 2005; Klug 2006]. Además, el hecho de que todas las cápsidas vacías del fago  $\Phi 29$  estén completamente colapsadas en aire después de la desecación indica que la expulsión del ADN es independiente del proceso de colapso, ya que la altura de las cápsidas colapsadas depende del ADN que permanece en el interior de éstas.

El proceso de desecación del virión MVM también provoca la expulsión del ADN vírico, pero a diferencia del fago  $\Phi 29$  las cápsidas vacías no colapsan. Algunas evidencias experimentales sugieren que el ADN podría salir de la cápsida del MVM a través de uno de los 12 poros localizados en los ejes de simetría 5 de la cápsida cuando el virus se encuentra en el núcleo de la célula infectada [Farr 2006]. La estructura atómica del virión del MVM muestra la presencia de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua y las cinco proteínas que rodean cada poro de la cápsida (Fig. 6.6) [Kontou 2005]. Si esas moléculas de agua son eliminadas durante el proceso de desecación, la interacción entre estas proteínas probablemente se debilitará, guiando a la apertura de los poros de la cápsida y a la consecuente liberación del ADN, bien por difusión o por despresurización como en el fago  $\Phi 29$ , aunque no se ha detectado la existencia de una alta presión interna en el virión MVM. Sin embargo, la densidad de empaquetamiento del ADN dentro del cápsida del MVM sí ha sido estimada [Carrasco 2006], alcanzando un valor muy alto (eficiencia de empaquetamiento ~35%) que puede

sobrepasar incluso el de los ácidos nucleicos de cadena simple en cristales moleculares, aproximándose al encontrado para el fago  $\Phi 29$ .

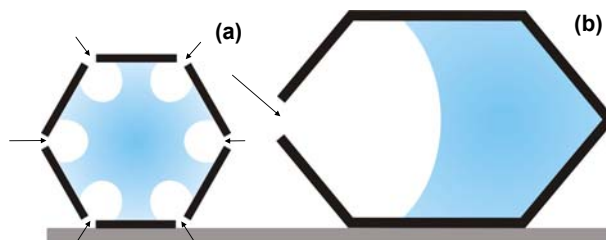


**Figura 6.6.** Reconstrucción atómica de las cinco proteínas (modelos de varilla) que rodean a uno de los 12 poros en cada eje de simetría 5 de la cápsida del MVM, junto con cinco moléculas de agua (modelos de van der Waals) formando enlaces de hidrógeno.

Además, en el MVM no hay una neutralización sustancial de las cargas negativas de los fosfatos del ADN, por lo que la presencia de una presión interna dentro del virión es una posibilidad que no queda descartada. Es difícil estimar la fracción de ADN liberado por la cápsida después del proceso de desecación, debido a la necesidad de asumir una uniformidad en la molécula, es decir, una conformación específica para el ADN de cada simple de este virus.

### 6.3.2. Fuerzas capilares

Si nos detenemos en la tabla 6.1 observamos que, mientras en aire después de la desecación la altura de las cápsidas vacías del MVM sólo decrece un 78%, las cápsidas vacías del fago  $\Phi 29$  colapsan pared con pared. Realmente, los resultados obtenidos para el virión del  $\Phi 29$  en aire después de la liofilización sugieren que en este virus la expulsión del 55% de longitud del ADN contenido en la cápsida conduce a una disminución parcial de su altura, que es independiente de la forma en la que la muestra es deshidratada, siendo esta disminución de un 36% para las condiciones de desecación y de liofilización. No obstante, en el caso de las cápsidas vacías del  $\Phi 29$  el comportamiento es muy diferente ya que mientras las cápsidas liofilizadas sólo colapsan a un 54%, las cápsidas deshidratadas en aire llegan a colapsar a un 13%. El colapso pared con pared de la cápsida vacía del fago  $\Phi 29$ , opuesto a la preservación de la integridad estructural de la cápsida vacía del MVM, puede estar relacionado con las diferencias estructurales y geométricas entre ambos virus. Nuestros resultados sugieren que el colapso del fago  $\Phi 29$  es parcialmente debido a las fuerzas capilares ejercidas por un menisco de agua que se puede formar dentro y fuera de las partículas durante las últimas etapas del proceso de desecación (Fig. 6.7).



**Figura 6.7.** Hipótesis sobre la formación de los meniscos de agua internos. (a) Cápsida icosaédrica del MVM junto con la forma simétrica del menisco. (b) Cápsida prolada del fago  $\Phi 29$  junto con la forma asimétrica del menisco. Los canales de apertura en cada cápsida están marcados por flechas. Nótese que el fago  $\Phi 29$  presenta dimensiones superiores a las del MVM.

Nuestra hipótesis de trabajo contempla dos tipos de meniscos actuando en el virus: uno exterior que une la pared externa de la cápsida con la superficie (no se muestra en la figura 6.7) y otro interno dentro de la cavidad del virus. Las fuerzas originadas por estos meniscos en esta nanoescala no son despreciables. Por ejemplo, la fuerza de adhesión creada por un menisco de agua entre una punta del AFM y una superficie es  $\sim 7$  nN [Maeda 2003], la cual es superior a la fuerza necesaria para romper un virus [Ivanovska 2004]. El colapso inducido por la deshidratación de dos superficies hidrofóbicas nanométricas muestra que la reducción de la densidad del líquido induce a la atracción entre ellas [Huang 2003]. Aunque la geometría de la cavidad de un virus es muy compleja, el menisco líquido interno, confinado entre las paredes de las cápsidas víricas que se están secando, puede jugar un papel decisivo para explicar la diferencia de los efectos de la desecación observados en las cápsidas del MVM y del fago  $\Phi 29$ . Mientras que el menisco de agua externo es similar para ambos virus, la estructura del menisco interno puede ser determinada por la geometría de la cavidad interna del virus. La cápsida del MVM tiene 12 poros distribuidos de forma simétrica en cada uno de los ejes de simetría 5. Aunque las moléculas de agua podrían pasar a través de la fina pared de la cápsida, es probable que puedan salir de forma más rápida a través de los poros durante las últimas etapas del proceso de desecación. Esto podría implicar la formación de un menisco de agua simétrico (Fig. 6.7.a), donde no se favorecen fuerzas en ninguna dirección. Sin embargo, en el fago  $\Phi 29$  el único canal conocido es el del conector localizado en uno de los extremos de la cápsida. Siguiendo el razonamiento planteado con el MVM, el agua dentro del  $\Phi 29$  podría salir de forma más rápida a través de dicho canal, creando así un menisco de agua asimétrico que provocaría el colapso del virus (Fig. 6.7.b). Además de las fuerzas capilares, las diferencias en las interacciones entre

las proteínas y en la dureza de ambas cápsidas (la estructura del MVM es más rígida que la del fago  $\Phi 29$ ) junto con otras posibles diferencias en el papel estructural de la hidratación, pueden también jugar un papel relevante en los efectos observados. Estas hipótesis deben ser comprobadas, ya que no hay muchos trabajos sobre la formación de meniscos de agua dentro de nanocavidades. Actualmente, se está trabajando en la realización de un modelo teórico para estimar la forma de los meniscos líquidos en el interior de las cápsidas víricas.

#### 6.4. RESUMEN

Hemos estudiado los efectos estructurales provocados por el proceso de desecación en dos cápsidas víricas diferentes. Hemos observado comportamientos distintos en la expulsión del ADN para el parvovirus MVM y para el bacteriófago  $\Phi 29$ . En el caso del MVM, tanto las cápsidas vacías como los viriones llenos de ADN no sufrieron ningún colapso significativo después de la desecación. En cambio, las partículas del fago  $\Phi 29$  después de la desecación sí sufrieron un colapso drástico, el cual depende fuertemente de la cantidad de ADN que permanece en el interior de la cápsida. Las imágenes de AFM después de la desecación revelaron que aproximadamente la mitad de la longitud total de la molécula de ADN es expulsada para la mayoría de los viriones del  $\Phi 29$  visualizados. Esta longitud es similar a la encontrada durante la primera etapa de expulsión o *push* en el proceso de inyección del ADN *in vivo*. La causa de la expulsión del ADN puede estar relacionada con cambios conformacionales inducidos por la deshidratación en las proteínas del conector y /o cola en el fago  $\Phi 29$  y en las regiones de la cápsida que rodean los poros en el virión del MVM. La presión interna existente en el virión del  $\Phi 29$ , y quizás también dentro del virión del MVM, puede ayudar a la expulsión del material genético. La comparación entre los resultados experimentales después del proceso de desecación y de liofilización demuestra claramente la acción de los meniscos de agua. Las fuerzas capilares ejercidas por los meniscos de agua, que pueden formarse tanto fuera como dentro de las cápsidas, durante las últimas etapas de la desecación pueden favorecer el colapso de la cápsida del  $\Phi 29$ , pero no el de la cápsida del MVM. Esta diferencia puede estar relacionada con la geometría de la cápsida ya que ésta puede definir la forma del menisco de agua originado dentro de la cápsida en la nanoescala.



## **CAPÍTULO 7:**

## **CONCLUSIONES.**





## 7. CONCLUSIONES

A continuación se exponen las principales conclusiones extraídas durante el desarrollo de la presente tesis. A lo largo de la exposición de este trabajo, hemos visto que el Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM) es una potente herramienta en el campo de la biofísica ya que no sólo permite obtener imágenes de alta resolución sino que también se pueden llevar a cabo otros tipos de medidas adicionales, como las propiedades mecánicas nanosistemas biológicos mediante la aplicación de indentaciones. Para trabajar con moléculas biológicas en condiciones fisiológicas los modos de operación más habituales son el *Jumping Mode* (JM) y el modo dinámico en modulación de amplitud (AM-DAFM). Mientras que con JM la fuerza aplicada sobre las muestras es controlada por el usuario, con AM-DAFM no lo es. Los principales problemas del AM-DAFM con excitación acústica son la aparición de múltiples picos en el espectro de frecuencias, conocido este fenómeno como “bosque de picos”, y el cálculo del valor de los picos máximos de fuerza de contacto. Hemos trabajado en estos dos problemas, donde las principales conclusiones a destacar son las siguientes:

- Mediante el análisis de la vibración térmica de la micropalanca ha sido posible eliminar los picos de resonancia espurios en el espectro de frecuencias, obteniendo un único pico limpio similar al observado en el espectro térmico. De esta forma evitamos la elección incorrecta del verdadero pico de resonancia.
- Mediante la combinación de experimentos y teoría hemos deducido los valores de los picos de fuerza máximos aplicados al final de cada ciclo de la oscilación. Un modelo teórico basado en un oscilador armónico forzado y amortiguado ha permitido desarrollar fórmulas analíticas de las fuerzas aplicadas oscilando en AM-DAFM con excitación acústica. Estas fórmulas muestran la dependencia de las fuerzas con parámetros característicos de las micropalancas (factor de calidad y constante elástica de muelle efectiva cerca de la superficie en líquidos), propiedades mecánicas

## 7. Conclusiones

---

de las muestras (constante elástica de muelle) y condiciones de operación (amplitud libre de oscilación y reducción de amplitud). Experimentalmente, los picos de fuerzas han sido medidos utilizando un método basado en la espectroscopia de aceleración, confirmando las predicciones teóricas de las fórmulas analíticas.

Se han caracterizado estructural y mecánicamente los microtúbulos, filamentos que componen el citoesqueleto en las células eucarióticas. También se ha investigado la interacción de éstos con la proteína tau, así como el efecto de esta interacción en la respuesta mecánica de los microtúbulos. Los resultados experimentales de las curvas de indentación se compararon con las predicciones de un modelo realizado con métodos de elementos finitos (FEM). Las principales conclusiones de este estudio son:

- Las imágenes de alta resolución de AFM de los microtúbulos muestran la estructura molecular de los protofilamentos en la cara exterior de éstos y la de los monómeros de tubulina en la cara interior, en concordancia con los datos proporcionados por criomicroscopía electrónica.
- Indentaciones del orden de 3.6 nm en la dirección radial provocan una deformación reversible del microtúbulo, resultando una respuesta elástica lineal. A partir de las curvas de indentación se puede cuantificar la constante elástica del microtúbulo,  $k = 0.07 \pm 0.013$  N/m. Los resultados de FEM para el modelo de un tubo hueco homogéneo e isótropo explican de forma correcta la respuesta elástica lineal encontrada experimentalmente, por lo que los resultados experimentales pueden ser explicados mediante la teoría de mecánica continua.
- Los modelos de FEM para indentaciones del orden del espesor de la pared en la dirección radial del tubo indican que es correcto aproximar la fuerza aplicada con una punta parabólica por una fuerza puntual.
- La aplicación de fuerzas del orden de 0.3 nN provocan un salto de  $\sim 1$  nm, debido a la ruptura de un pequeño número de enlaces laterales y/o axiales de tubulina. Este salto es reversible sugiriendo un mecanismo de auto-reparación de la estructura del microtúbulo. La aplicación de fuerzas superiores a 0.3 nN provocan la despolimerización del microtúbulo.
- La proteína tau forma una capa de espesor de 1 nm alrededor de la estructura cilíndrica del microtúbulo interaccionando sólo con la parte superior de los protofilamentos, por lo que no rellenan los huecos entre ellos.

- La elasticidad radial de los microtúbulos recubiertos con tau es cualitativa y cuantitativamente indiscernible en comparación con la elasticidad radial de los microtúbulos sin tau, lo cual es consistente con la unión de tau a lo largo de los protofilamentos. Esta hipótesis es verificada mediante la invariabilidad encontrada en la respuesta mecánica de microtúbulos recubiertos con kinesina. La unión de tau a los protofilamentos sí induce un aumento de la resistencia de los microtúbulos contra la ruptura de los enlaces de tubulina.

- Las simulaciones de FEM para la respuesta elástica de un microtúbulo recubierto con tau indican que ésta debe interaccionar con el microtúbulo uniéndose a la parte superior de los protofilamentos.

Se ha estudiado la interacción del motor molecular kinesina sobre el microtúbulo tanto en su estado inmovilizado (AMP-PNP) como en su estado dinámico (ATP) sobre el mismo. Las principales conclusiones se resumen en:

- El grado de recubrimiento y número de defectos indican que en el estado AMP-PNP el motor interacciona con el microtúbulo de forma no cooperativa.

- Las imágenes de alta resolución de AFM de microtúbulos recubiertos con kinesina en el estado AMP-PNP muestran que las cabezas individuales del motor dímérico se unen a lo largo de un único protofilamento y no entre dos protofilamentos vecinos.

- En el estado ATP los motores están la mayor parte de su ciclo mecánico-químico unidos con ambas cabezas a lo largo de un único protofilamento.

- El empleo de una concentración baja de ATP permitió disminuir la velocidad de los motores a valores entre 2 y 5 nm/s, siendo captado el movimiento de motores individuales a lo largo de un mismo protofilamento realizando pasos de 8 nm.

- Bajo condiciones de saturación o aglomeración, la velocidad de los motores disminuye y si se encuentran con un obstáculo en su camino se detienen detrás de éste.

Se ha caracterizado estructural y mecánicamente al virus diminuto del ratón (MVM), tanto vacío como lleno de material genético (ADN de cadena simple). También se han investigado las posibles consecuencias de la manipulación genética en la respuesta mecánica de este virus. Las principales conclusiones extraídas de este trabajo son las siguientes:

## 7. Conclusiones

---

- Las imágenes de alta resolución de AFM del MVM orientado a lo largo de los tres ejes de simetría de su estructura icosaédrica revelan las mismas características topográficas que las proporcionadas por los modelos atómicos de rayos-X. No se han encontrado diferencias topográficas y/o dimensionales entre cápsidas vacías y viriones llenos de ADN.

- La cápsida vacía presenta un comportamiento mecánico isótropo a lo largo de los tres ejes de simetría analizados. En cambio, la presencia del ADN en el interior del virión induce un reforzamiento mecánico anisótropo del virus de un 3%, 40% y 140% a lo largo de los ejes de simetría 5, 3 y 2 respectivamente.

- Las predicciones de un modelo de FEM indican que el reforzamiento mecánico anisótropo del virión es causado por 60 zonas de unión entre ADN y la pared interna de la cápsida, las cuales son visualizadas cristalográficamente, por lo que el ADN no solo almacena información de forma pasiva sino que participa activamente como componente arquitectónico en la estructura, propiedades y funciones, contribuyendo al reforzamiento mecánico anisótropo del virión.

- Los resultados de las simulaciones de FEM también sugieren que el 70% del ADN desordenado está distribuido dentro de la cápsida sin fuertes interacciones con la pared interna de la misma.

- Mediante la aplicación de mutación genética dirigida, eliminando la mayor parte de las interacciones entre la cápsida y el ADN visualizado cristalográficamente, se ha medido el efecto de las mutaciones en la respuesta mecánica de las partículas víricas, comprobándose las predicciones teóricas del modelo de FEM.

- Se ha demostrado que las propiedades mecánicas de complejos biomoleculares pueden ser racionalmente manipuladas utilizando ingeniería de proteínas.

- Desde el punto de vista biológico, algunas evidencias experimentales muestran que la entrada y salida del ADN se realiza por los poros localizados en el eje de simetría 5, por lo que la anisotropía encontrada podría tener un importante papel biológico para permitir una máxima dureza de la partícula vírica sin cancelar los cambios conformacionales necesarios para su infectividad.

- Desde el punto de nanotecnológico, la ingeniería usada por el MVM puede servir de ejemplo para el diseño de redes artificiales de ADN o nano-objetos con determinadas propiedades.

Por último, se han estudiado los efectos estructurales inducidos por el proceso de desecación en dos cápsidas y viriones geoméricamente diferentes. Las principales conclusiones de este estudio se resumen en:

- Tanto los viriones del MVM como los del  $\Phi 29$  expulsan su material genético después de la desecación. El virión MVM no sufre ningún colapso significativo mientras que el virión  $\Phi 29$  sufre un colapso parcial en función de la cantidad de ADN que permanece en el interior de la cápsida. La causa de la expulsión del ADN puede estar relacionada con ciertos cambios conformacionales en las proteínas y con la alta presión interna que presentan estos virus.

- Las cápsidas vacías del MVM no sufren ningún cambio estructural importante después de la desecación. En cambio, todas las cápsidas vacías del  $\Phi 29$  sufren un colapso drástico, pared con pared.

- El origen de la disimilitud anterior lo encontramos en la acción de las fuerzas capilares ejercidas por los meniscos de agua en el proceso de desecación. La forma de los meniscos de agua en el interior de la cápsida puede depender de la geometría de la misma. Este hecho, junto con la diferente resistencia mecánica que presenta una cápsida frente a la otra, pueden explicar las diferencias estructurales observadas entre ambas cápsidas vacías después del proceso de desecación.



**APÉNDICES**  
**ABREVIATURAS**  
**BIBLIOGRAFÍA**





## **I. PREPARACIÓN DE SUPERFICIES Y MUESTRAS**

Este apéndice está dedicado a explicar en primer lugar, la preparación de las distintas superficies utilizadas para depositar las diversas muestras biológicas que hemos estudiado, como las cápsidas víricas, los microtúbulos, etc., y en segundo lugar, a la preparación de tales muestras biológicas.

### **I.1. PREPARACIÓN DE SUPERFICIES**

Debido a que el AFM no requiere el empleo de substratos conductores, una amplia variedad de superficies pueden ser utilizadas [Shao 1996]. Las dos superficies que habitualmente hemos usado son superficies de vidrio, para trabajar en medio líquido y superficies de mica, para trabajar en aire. A continuación, vamos a exponer el protocolo de limpieza llevado a cabo para estos dos tipos de superficies y sus posteriores tratamientos con el objetivo de hacerlas activas químicamente. Las diferentes preparaciones o tratamientos de las superficies que vamos a utilizar dependen críticamente del tipo de muestra que queramos depositar sobre ellas y del tipo de enlace que queremos que se establezca [Amrein 1999]. Una correcta preparación de las superficies y de las muestras es crucial a la hora de realizar los experimentos propuestos con éxito.

#### **I.1.1. Superficies de vidrio**

El vidrio se fabrica a partir de una mezcla compleja de compuestos vitrificantes como sílice, fundentes como los álcalis y estabilizantes como la cal. Es un material duro, frágil y transparente que ordinariamente se obtiene por la fusión de esta mezcla compleja a unos 1.500 °C. Las superficies de vidrio que empleamos normalmente en los experimentos de AFM son los denominados cubreobjetos que se utilizan en microscopía óptica.

#### I.1.1.1. Limpieza de las superficies de vidrio

Hay varios métodos para la limpieza de superficies de vidrio. En las superficies utilizadas en nuestros experimentos hemos seguido el siguiente protocolo de limpieza:

(1) Se prepara la siguiente disolución: 35 g de KOH son diluidos en 35 ml de H<sub>2</sub>O, a los que añadimos 300 ml de etanol.

(2) Los vidrios colocados en un portavidrios, diseñado de forma que los vidrios no se tocan entre ellos, se sumergen en una cubeta de vidrio limpia con la disolución anterior y son sonicados durante 5 min.

(3) Se retira la disolución de KOH de la cubeta y se sustituye por agua pura. Los vidrios son nuevamente sonicados durante 5 min en agua pura. Este proceso se repite 3 veces. Hay que tener cuidado de que no se formen burbujas sobre las superficies.

(4) El portavidrios es sacado de la cubeta y colocado encima de un papel absorbente para eliminar toda la cantidad de agua remanente. Por último, el portavidrios con los vidrios se introduce en un horno a ~100 °C durante ~30 min hasta que éstos se hayan secado completamente.

El proceso de la limpieza es esencial para el tratamiento de las superficies que vamos a comentar a continuación.

#### I.1.1.2. Superficies hidrofóbicas

Una vez que las superficies de los vidrios están limpias siguiendo el protocolo comentado en I.1.1.1, las superficies ya pueden ser tratadas con otro procedimiento químico, que las convierta en superficies hidrofóbicas para que queden cargadas positivamente. Con este fin, es muy habitual el uso de varios derivados químicos de los silanos. A continuación, nombramos los procedimientos y productos químicos que hemos utilizado, aunque existen muchos más. Los productos químicos usados fueron adquiridos en [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Todos estos procesos deben realizarse en una campana de extracción de gases.

1) Superficies tratadas con hexamethyldisilazane (HMDS), (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Si-NH-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Las superficies de vidrios previamente limpias son tratadas con el vapor proveniente del HMDS. Para ello, los vidrios sobre el portavidrios son colocados en una cubeta limpia de vidrio, en cuyo interior previamente añadimos entre 3 y 4 ml de HMDS, cubriendo sólo la base de la cubeta y formando una capa de espesor ~1 mm. La

cubeta se cierra y se deja un tiempo de ~12 h dentro de la campana de extracción de gases para que el vapor del HMDS actúe sobre las superficies de los vidrios. Después de este tiempo, el portavidrios se saca de la cubeta y se deja unos minutos fuera para que los vidrios se sequen al aire. Posteriormente, los vidrios se guardan en alguna caja cerrada (por ejemplo, en un *petri dish*) para evitar que se contaminen, hasta su empleo en los experimentos de AFM.

Las superficies de vidrio tratadas con el vapor del HMDS nos han servido para inmovilizar a las partículas víricas en medio líquido.

2) Superficies tratadas con 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTS),  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ . Se prepara una disolución al 0.1% de APTS: 20  $\mu\text{l}$  de APTS diluido en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Los vidrios sobre el portavidrios son sumergidos en una cubeta limpia de vidrio con la disolución anterior durante 15 min. Durante este tiempo la disolución debe ser agitada. Luego, los vidrios se lavan con isopropanol y se sonicen inmersos en agua limpia en la cubeta de vidrio durante 5 min. Este último proceso se repite tres veces. Por último, se sacan de la cubeta y se secan en un horno a ~65 °C. La superficie quedará cargada positivamente.

3) Superficies tratadas con trimethoxysilyl-propyl-diethylenetriamine (DETA),  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ . Se prepara una disolución al 1% de DETA: 20  $\mu\text{l}$  de DETA diluido en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético. Las superficies de vidrios limpias son inmersas en la cubeta limpia de vidrio junto con la disolución anterior durante 5 min. Después, esta disolución se sustituye por agua limpia y los vidrios se sonicen inmersos en agua limpia durante 5 min. Este proceso se repite tres veces. Finalmente, los vidrios se sacan de la cubeta y se secan en un horno a ~110 °C. La superficie quedará cargada positivamente.

Las dos últimas superficies nos han servido para inmovilizar a los microtúbulos [Turner 1995] cargados negativamente, así como a microtúbulos incubados con la proteína tau y con el motor molecular kinesina, todos ellos en medio líquido.

### **I.1.2. Superficies de mica**

Las micas son minerales pertenecientes a un grupo numeroso de silicatos de alúmina, hierro, calcio, magnesio y minerales alcalinos. La mica que utilizamos normalmente en los experimentos de AFM es la mica moscovita, que contiene potasio

y aluminio. En comparación con los otros tipos de mica, esta clase presenta unas mejores propiedades eléctricas, más resistencia mecánica y es más dura, flexible y elástica.

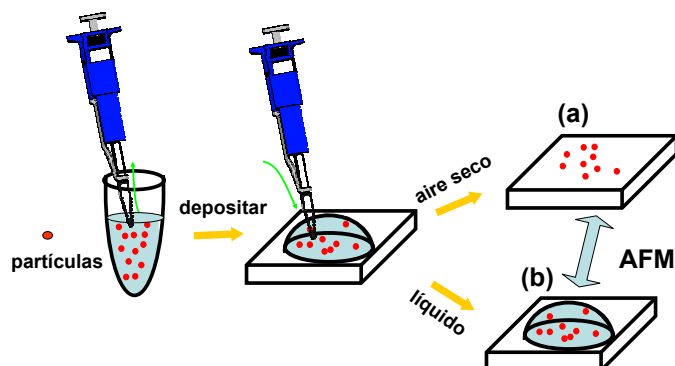
#### **I.1.2.1. Limpieza de las superficies de mica**

La limpieza de la superficie de mica es mucho más sencilla que la del vidrio ya que ésta se caracteriza por su fácil exfoliación en láminas delgadas flexibles, elásticas y muy brillantes. Por lo que basta con exfoliar la cara descubierta con algún tipo de cinta adhesiva para obtener una superficie plana de mica fresa sin contaminar.

#### **I.1.2.2. Poly-L-lysine**

A la superficie recién exfoliada de mica le añadimos 30  $\mu$ l de poly-L-lysine (esta cantidad puede variar en función del área de la mica que vayamos a usar) y esperamos 5 min. Después de este tiempo, lavamos la superficie con agua limpia y secamos con nitrógeno líquido. De esta forma, conseguimos superficies de mica cargadas positivamente. Esta superficie nos ha servido para inmovilizar a las partículas víricas en aire.

Para la adsorción de todas las muestras biológicas estudiadas sobre las distintas superficies comentadas anteriormente procedemos de la misma forma: se depositan 20  $\mu$ l de la muestra que queramos estudiar diluida en su medio fisiológico sobre la superficie ya tratada y esperamos 30 min para que las partículas se adsorban. Después de este tiempo, tenemos dos posibilidades, representadas en la figura I.1: por un lado, podemos trabajar en aire, para lo cual lavamos la muestra con agua limpia con el objetivo de eliminar todas las sales del *buffer* fisiológico y secamos la superficie con nitrógeno seco (Fig. I.1.a) y por otro lado, podemos trabajar en medio líquido, para lo cual enjuagamos la muestra varias veces con el *buffer* fisiológico adecuado en cada caso y dejamos la muestra en líquidos, es decir, inmersa en el *buffer* fisiológico (Fig. I.1.b).



**Figura I.1.** Representación esquemática de la preparación y adsorción de muestras en aire (a) y en medio líquido (b), para su posterior visualización en AFM.

## I.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las principales muestras de origen biológico que hemos estudiado son las partículas víricas, tanto cápsidas como viriones pertenecientes al bacteriófago  $\Phi 29$  y al virus diminuto del ratón (MVM), los microtúbulos, la proteína tau y la proteína motora kinesina interaccionando ambas con los microtúbulos. A continuación, vamos a describir la preparación de estas muestras para su empleo óptimo en los experimentos con el AFM.

### I.2.1. Experimentos con el virus MVM

Las cápsidas vacías y viriones infecciosos del MVM sin mutar así como los virus mutados fueron producidos y purificados por el grupo del Dr. Mauricio G. Maute como se describe en [Hernando 2000] con algunas modificaciones. En el caso de los virus mutados, la presencia de las mutaciones fue confirmada por secuenciación. Las cápsidas vacías y viriones fueron separadas gracias a sus diferentes densidades y fueron dializadas usando un *buffer* fisiológico de pH 7.3, denominado PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 8.1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). En la preparación quedó excluida cualquier posibilidad de contaminación entre cápsidas y viriones. La pureza e integridad de las cápsidas vacías y viriones fue comprobada mediante las imágenes de EM y su concentración fue estimada por espectrofotometría UV. Para los experimentos de AFM, los stocks iniciales de cápsidas vacías (1  $\mu\text{M}$ ) y de viriones (0.3  $\mu\text{M}$ ) fueron diluidos 20 veces en PBS.

### **I.2.2. Experimentos con el fago $\Phi 29$**

Las cápsidas vacías y viriones llenos fueron producidos y purificados por el grupo del Prof. José L. Carrascosa como se describe en [Anderson 1966] con algunas modificaciones. Las partículas de  $\Phi 29$  fueron dializadas en un *buffer* fisiológico de pH 7.8, denominado TMS (50mM Tris, 10mM  $MgCl_2$ , 100 mM NaCl). El material genético fue extraído del interior de los viriones mediante un tratamiento con  $NaClO_4$  [Freifelder 1966; Tao 1998], en el que las cápsidas vacías fueron posteriormente centrifugadas y resuspendidas en TMS. Para los experimentos de AFM, los stocks de cápsidas vacías ( $5 \times 10^4$  partículas/ml) y de viriones ( $1 \times 10^4$  partículas/ml) fueron diluidos 100 veces en TMS.

### **I.2.3. Experimentos con microtúbulos**

La tubulina y las isoformas de la proteína tau fueron purificadas por I. A. T. Schaap de un cerebro porcino empleando métodos estándares [Williams 1982]. La tubulina fue polimerizada a una concentración de 3 mg/ml mediante el uso de 10% de glicerol y 1 mM de GTP y sometido a un proceso de incubación a una temperatura de 36 °C durante 30 min. Los MTs fueron diluidos y usados como solución stock a una concentración de 0.15 mg/ml en un *buffer* fisiológico de pH 6.9, denominado PEM80 (80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 2 mM  $MgCl_2$ ) junto con 10  $\mu M$  de *taxol* para prevenir la despolimerización de los mismos. Para reducir los artefactos en las imágenes de AFM el *buffer* fisiológico PEM80 fue centrifugado durante 2 h a 100000g antes de añadir el *taxol*. Para los experimentos de AFM, los MTs de la solución stock fueron diluidos a 7.5  $\mu g/ml$  en el *buffer* fisiológico PEM80.

#### **I.2.3.1. Experimentos con microtúbulos y la proteína tau**

Para los experimentos de AFM realizamos sobre la interacción de los MTs con la proteína tau utilizamos diversas estequiometrías tau/monómeros de tubulina, las cuales están indicadas en cada figura del capítulo 3. En todos los casos la proteína tau fue añadida a los MTs en disolución en un tiempo de incubación de 30 min a 37 °C para favorecer su unión con los MTs. Después de este tiempo los MTs unidos a la proteína tau fueron depositados sobre la superficie de vidrio, por lo que la tau recubre toda la estructura cilíndrica del MT.

### **I.2.3.2. Experimentos con microtúbulos y la kinesina**

El motor molecular estudiado en el capítulo 4 es un miembro de la familia de la kinesina-1, en concreto se trata de la kinesina NcKin433 truncada, la cual fue proporcionada por Günther Wöhlke, Munich. La preparación del motor está descrita en [Kallipolitou 2001]. En los experimentos de AFM para estudiar la interacción de la kinesina con el MT, la kinesina fue siempre añadida a los MTs adsorbidos ya sobre la superficie, por lo que los motores sólo recubren el lado expuesto del MT. Para prevenir la unión de la kinesina con la superficie de vidrio, la muestra con los MTs (antes de añadir la kinesina) fue lavada con 20  $\mu\text{g/ml}$  de la proteína caseína en *buffer* fisiológico PEM80 con *taxol* con el fin de bloquear la superficie.

Para los experimentos de la kinesina inmovilizada sobre los MTs, ésta es añadida en las proporciones motor/dímeros de tubulina indicadas en cada figura (que varían en cada experimento) en presencia de  $\sim 15 \mu\text{M}$  de AMP-PNP. Para los experimentos de movilidad, tanto en condiciones de saturación como en las condiciones donde observamos motores individuales, se emplearon las concentraciones respectivas indicadas en cada figura en presencia de  $\sim 0.5 \mu\text{M}$  de ATP.





## II. CONCEPTOS GENERALES DE TEORÍA DE ELASTICIDAD LINEAL

### II.1. MÓDULOS ELÁSTICOS

Un sólido se considera elástico si bajo la acción de una fuerza externa se deforma reversiblemente, es decir, cuando la fuerza deja de actuar el sólido recupera su forma original. La deformación de un objeto se define cómo un cambio en su forma provocado por la acción de una fuerza aplicada, las cuales pueden ser fuerzas de elongación (*pulling*), de compresión (*pushing*), de corte (*shear*), de curvatura o flexión (*bending*) o de torsión (*twisting*). La teoría de la elasticidad describe de qué forma un sólido se deforma como respuesta a una fuerza exterior aplicada. La teoría de la elasticidad lineal estudia los casos donde los esfuerzos (*stress*) sobre un sólido elástico son funciones lineales de las tensiones o deformaciones (*strain*). La deformación de un cuerpo elástico lineal se describe a través de las ecuaciones constitutivas, las cuales relacionan el tensor de esfuerzo  $\sigma$  con el tensor de deformación  $\varepsilon$ :

$$\sigma_{ij} = \sum_{k,l} C_{ijkl} \varepsilon_{kl} \quad (1)$$

Son necesarios 21 coeficientes para describir la respuesta elástica lineal de un material anisótropo. Para un material elástico homogéneo e isótropo, la ecuación constitutiva (1) se reduce a:

$$\sigma = \lambda \varepsilon \quad (2)$$

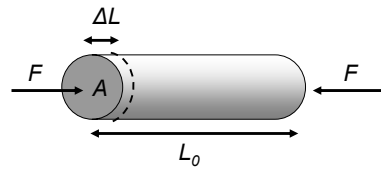
donde  $\sigma$  es el esfuerzo unitario, es decir, la fuerza aplicada distribuida uniformemente sobre un área  $A$ ,  $\varepsilon$  es la deformación unitaria, es decir, el cambio de longitud por unidad de longitud y  $\lambda$  es el módulo elástico que depende del material y de la naturaleza de la deformación.

La teoría de la elasticidad lineal es sólo aplicable a deformaciones pequeñas, de tal manera que las deformaciones y los desplazamientos están relacionados

linealmente. Un sólido elástico lineal sometido a grandes desplazamientos no cumplirá esta condición. Es posible exceder el límite elástico de un objeto si se aplica un esfuerzo suficientemente grande, en cuyo caso el objeto quedará deformado irreversiblemente. En este caso la deformación deja de depender linealmente del esfuerzo.

En un sólido se consideran principalmente cuatro tipos de deformación en las que se define un módulo elástico  $\lambda$  específico para cada una:

1) **Módulo de Young ( $E$ )**: mide la elasticidad en la longitud, es decir, la resistencia de un sólido a sufrir una elongación o una compresión.



**Figura I.1.** Un cilindro de longitud inicial  $L_0$  es comprimido mediante la acción de una fuerza externa  $F$  aplicada perpendicularmente a la sección transversal  $A$ , acortándose su longitud una cantidad  $\Delta L$ .

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta L/L_0} = \frac{FL_0}{A\Delta L} \quad (3)$$

donde  $F$  es la fuerza aplicada,  $L_0$  es la longitud original del objeto,  $A$  es el área de la sección transversal y  $\Delta L$  es el cambio en longitud.

De igual forma, el módulo de Young puede ser utilizado para calcular la fuerza ejercida sobre un objeto cuando se encuentra sometido a una elongación o a una compresión:

$$F = \left( \frac{EA}{L_0} \right) \Delta L = kx \quad (4)$$

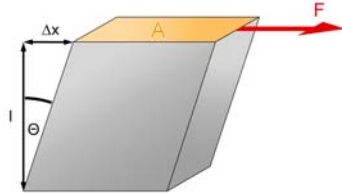
donde  $k$  es la constante elástica de muelle o constante de rigidez axial y  $x$  es la deformación. La ecuación (4) constituye la ley de Hooke para un muelle ideal.

El módulo de Young también está relacionado con la constante de rigidez flexural  $k_{flex}$ , que se define como el par de fuerzas necesario para curvar una estructura sólida por unidad de curvatura producida y viene dada por:

$$k_{flex} = EI \quad (5)$$

donde  $E$  es el módulo de Young e  $I$  es el segundo momento de inercia.

2) Módulo de corte o de elasticidad transversal ( $G$ ): mide la elasticidad de la forma, es decir, la resistencia al movimiento de los planos de un sólido, deslizándose uno respecto al otro. Bajo esta deformación no se provoca cambio en el volumen.

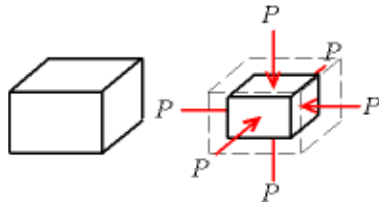


**Figura I.2.** Un paralelepípedo rectangular se deforma por la acción de una fuerza  $F$  aplicada tangencialmente a una de sus caras de área  $A$ , mientras que la cara opuesta se mantiene fija.

$$G = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F/A}{\Delta x/l} = \frac{Fl}{\Delta x A} \quad (6)$$

donde  $F$  es la fuerza aplicada tangencialmente al área  $A$ ,  $l$  es la longitud inicial,  $\Delta x$  es el desplazamiento transversal y  $A$  es el área en la cual la fuerza actúa.

3) Módulo volumétrico ( $K$ ): mide la elasticidad del volumen, es decir, la resistencia que ofrecen los sólidos o líquidos a un cambio en su volumen. Un cuerpo sometido a esta deformación experimenta un cambio en el volumen, pero no en la forma. El módulo volumétrico es una extensión del módulo de Young en tres dimensiones.

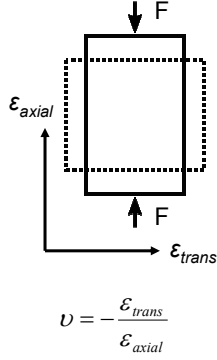


**Figura I.3.** Un sólido es comprimido sobre todas las caras por fuerzas externas normales a sus superficies.

$$K = \frac{\sigma}{\varepsilon} = -\frac{F/A}{\Delta V/V} = -\frac{\Delta P}{\Delta V/V} \quad (7)$$

donde  $\Delta P$  es el esfuerzo volumétrico o presión,  $V$  es el volumen original y  $\Delta V$  es el cambio en volumen. El recíproco del módulo volumétrico se denomina compresibilidad del material.

4) Coeficiente de Poisson ( $\nu$ ): mide la razón entre la deformación de compresión relativa o deformación transversal, es decir, normal a la fuerza aplicada y la deformación de elongación relativa o deformación axial, es decir, en la dirección de la fuerza aplicada.



**Figura I.4.** Un objeto rectangular es sometido a una fuerza de compresión en una dirección, lo cual provoca una contracción en la misma dirección y una elongación en la dirección perpendicular a la fuerza aplicada.

donde  $\epsilon_{trans}$  y  $\epsilon_{axial}$  son la deformación transversal y axial respectivamente.

Para los materiales homogéneos e isotrópos los distintos módulos elásticos están relacionados entre ellos mediante ecuaciones simples.

## II.2. RESPUESTA ELÁSTICA DE UN SÓLIDO

En los experimentos de indentación realizados en microscopía de fuerzas se produce una fuerza elástica de contacto entre la punta de la micropalanca y la muestra en función de la deformación o indentación  $\delta$ . En la teoría de elasticidad el problema del contacto entre dos superficies esféricas se resuelve asumiendo una geometría simétrica respecto al eje Z y una fuerza  $F$  aplicada en la dirección del eje de simetría. La respuesta elástica de un sistema sometido a una fuerza  $F$  puede ser no lineal o lineal.

### II.2.1. Modelo de Hertz

El modelo mecánico de Hertz desarrollado para contactos elásticos entre dos cuerpos [Hertz 1882] (Fig. I.5), predice un comportamiento elástico no lineal en el que la fuerza aplicada y la deformación están relacionadas por la siguiente expresión:

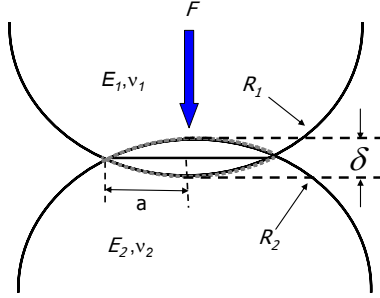
$$F = \sqrt{\left(\frac{16RE^{*2}}{9}\right)} \delta^{3/2} \quad (9)$$

donde  $F$  es la fuerza aplicada,  $a$  es el radio del área de contacto,  $\delta$  es la deformación,  $R$  es el radio relativo de curvatura:

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \quad (10)$$

y  $E^*$  es el módulo de Young efectivo:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1-\nu_1^2}{E_1} + \frac{1-\nu_2^2}{E_2} \quad (11)$$



**Figura I.5.** Contacto elástico entre dos superficies esféricas de radios  $R_1$  y  $R_2$ , con módulos de Young  $E_1$  y  $E_2$  y coeficientes de Poisson  $\nu_1$  y  $\nu_2$ . Mediante la acción de la fuerza aplicada  $F$  induce un área de contacto de radio  $a$  entre ambas esferas provocando una deformación  $\delta$ .

donde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  son los radios de curvatura, módulos de Young y coeficientes de Poisson de ambos cuerpos esféricos respectivamente.

Las condiciones para que la respuesta elástica no lineal de un sistema pueda ser descrita según el modelo de Hertz son las siguientes:

1)  $a \ll R$

2)  $a \ll R_{1,2}$ ,  $a \ll 1$

3) Se asume un contacto sin fricción, sólo actúa una fuerza normal entre las superficies.

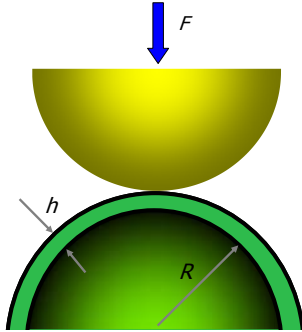
Si se hace que uno de los radios tienda a infinito el problema corresponde al contacto mecánico entre una esfera y un plano.

### II.2.2. Modelo de cáscara elástica delgada

El modelo de cáscara elástica delgada [Landau 1986] es sólo aplicable para los objetos denominados de “cáscara delgada” o “*thin shell*” cuyo espesor de pared  $h$  es mucho menor que el radio de curvatura  $R$ , es decir, deben cumplir la condición  $h \ll R$  (Fig. I.6). Este modelo predice un comportamiento elástico lineal en el que la fuerza aplicada  $F$  y la deformación  $\delta$  son proporcionales entre sí hasta indentaciones del orden de espesor de la pared del objeto  $h$  o “*shell*”:

$$F = k\delta \quad (11)$$

donde  $F$  es la fuerza aplicada,  $\delta$  es la deformación y  $k$  es la constante de proporcionalidad, que en los experimentos de indentación en microscopía de fuerzas se corresponde con la constante elástica de muelle o constante de rigidez axial del objeto.



**Figura I.6.** Objeto denominado de “cáscara delgada” o “*thin shell*” de espesor de la pared  $h$  y radio de curvatura  $R$ . Si el espesor de pared es mucho menor que su radio de curvatura se producirá una respuesta elástica lineal bajo la acción de una fuerza externa  $F$  aplicada.

$$h \ll R$$

Para geometrías esféricas que cumplen el modelo de cáscara de pared delgada, como las cápsidas víricas estudiadas en el capítulo 5, la fuerza aplicada depende de la indentación de la siguiente forma:

$$F = \frac{\alpha E h^2}{R} \delta \quad (12)$$

Para geometrías cilíndricas que cumplen el modelo de cáscara de pared delgada, como los microtúbulos estudiados en el capítulo 3, la fuerza aplicada depende de la indentación de la siguiente forma

$$F = \frac{\beta E h^{5/2}}{R^{3/2}} \delta \quad (13)$$

donde  $E$  es el módulo de Young,  $h$  el espesor del “shell”,  $R$  el radio y  $\alpha$  y  $\beta$  son prefactores geométricos que pueden ser calculados por métodos analíticos.

Cuando las indentaciones son superiores al espesor de la pared, el comportamiento mecánico deja de ser lineal.

**ABREVIATURAS**

SPM	Scannind Probe Microscopy o microscopía de proximidad
AFM	Atomic Force Microscopy o microscopía de fuerzas atómicas
STM	Scanning Tunneling Microscopy o microscopía de efecto túnel
EM	Electronic Microscopy o microscopía electrónica
TEM	Transmition Electronic Microscopy o microscopía electrónica de transmisión
SEM	Scanning Electronic Microscopy o microscopía electrónica de barrido
MFM	Magnetic Force Microscopy o microscopía de fuerzas magnéticas
vdW	van der Waals
CM	Contact Mode o modo de contacto
DAFM	Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico
AM-DAFM	Amplitude Modulation Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico de modulación en amplitud
FM-DAFM	Frecuency Modulation Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico de modulación en frecuencia
NC-DAFM	Non Contact Dynamic Atomic Force Microscopy o modo dinámico de no contacto
JM	Jumping Mode o modo de salto
FZ	Force versus Distance o fuerza frente a distancia
UHV	Ultra-High-Vacuum o ulta alto vacío
DSP	Digital Signal Processor o procesador digital de señales
DAC	convertidor de señal digital a analógica
ADC	convertidor de señal analógica a digital
FV	Force Volumen

## Abreviaturas

---

PFM	Pulsed Force Mode
3D	3 dimensiones
EDDL	Electrostatic Debye Double Layer o electrostática de la doble capa de Debye
DDL	Debye Double Layer o doble capa de Debye
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
MT	Microtúbulo
Pf	Protofilamento
GTP	Guanosín Trifosfato
GDP	Guanosín Difosfato
MAPs	Microtubules Associated Proteins o proteínas asociadas a los microtúbulos
PDB	Protein Data Bank o banco de datos de proteínas
FEM	Finite Element Method o método de elementos finitos
Kn	kinesina convencional
ATP	adenosín trifosfato
ADP	adenosín difosfato
AMP-PNP	adenilil imidodifosfato
MVM	Murine Minute Virus o virus diminuto del ratón
FvK	Foppl-von-Karman
TMV	Tobacco mosaic virus o virus del mosaico del tabaco
CCMV	Cowpea Chlorotic Mottle Virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses o comité internacional de taxonomía de virus
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ssDNA	single stranded deoxyribonucleic acid o ácido desoxirribonucleico de cadena simple



## BIBLIOGRAFÍA

- [A-Hassan 1998] A-Hassan, E., Heinz, W.F., Antonik, M.D., D'Costa, N.P., Nageswaran, S., Schoenenberger, C.A., Hoh, J.H. (1998). "Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy." Biophys. J **74**: 1564-1578.
- [Agbandje-McKenna 1998] Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A. L., Wang, F., Tattersall, P., Rossmann, M. G. (1998). "Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice." Structure **6**(11): 1369-1381.
- [Al-Bassam 2002] Al-Bassam, J., Ozer, R.S., Safer, D., Halpain, S., Milligan, R.A. (2002). "MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments." J. Cell Biol. **157**: 1187-1196.
- [Alberts 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science.
- [Albrecht 1991] Albrecht, T. R., Grütter, P., Horne, D., Rugar, D. (1991). "Frequency modulation detection using high-Q cantilevers for enhanced force microscope sensitivity." J. Appl. Phys. **69**: 668-673.
- [Amos 1995] Amos, L. A. (1995). "The microtubule lattice-20 years on." Trends Cell Biol. **5**(2): 48-51.
- [Amos 1999] Amos, L. A., Lowe, J. (1999). "How Taxol stabilises microtubule structure." Chem. Biol. **6**: R65-R69.
- [Amrein 1999] Amrein, M., Müller, D. J. (1999). "Sample preparation techniques in scanning probe microscopy." Nanobiology **4**: 229-256.
- [Anczykowski 1999] Anczykowski, B., Gotsmann, B., Fuchs, H., Cleveland, J.P., Elings, V.B. (1999). "How to measure energy dissipation in dynamic mode atomic force microscopy." Appl. Surf. Sci. **140**: 376-382.
- [Anderson 1966] Anderson, D. L., Hickman, D. D., Reilly, B. E. (1966). "Structure of *Bacillus subtilis* Bacteriophage phi29 and the Length of phi29 Deoxyribonucleic Acid." J. Bacteriol. **91**: 2081-2089.
- [Ando 2003] Ando, T., Kodera, N., Naito, Y., Kinoshita, T., Furuta, K., Toyoshima, Y.Y. (2003). "A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action." Chemphyschem. **4**(11): 1196-1202.
- [Asbury 2003] Asbury, C. L., Fehr, A.N., Block, S.M. (2003). "Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism." Science **302**: 2130-2134.
- [Ashkin 1987] Ashkin, A., Dziedzic, J.M. (1987). "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria." Science **235**(4795): 1517-1520.
- [Attard 2001] Attard, P., Miklavcic, S. J. (2001). "Effective Spring Constant of Bubbles and Droplets." Langmuir **17**(26): 8217 - 8223.

## Bibliografia

---

- [Baker 1999] Baker, T. S., Olson, N. H., Fuller, S. D. (1999). "Adding the Third Dimension to Virus Life Cycles: Three-Dimensional Reconstruction of Icosahedral Viruses from Cryo-Electron Micrographs" Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**(4): 862-922.
- [Baltimore 1971] Baltimore, D. (1971). "Expression of Animal Virus Genomes." Bacteriol. Rev. **35**(3): 235-241.
- [Baro 1985] Baro, A. M., Miranda, R., Alaman, J., Garcia, N., Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., Carrascosa, J. L. (1985). "Determination of surface topography of biological specimens at high resolution by scanning tunnelling microscopy." Nature **315** (6016): 253-4.
- [Basak 2007 (b)] Basak, S., Beyder, A., Spagnoli, C., Raman, A., Sachs, F. (2007 (b)). "Hydrodynamics of torsional probes for atomic force microscopy in liquids." Journal of Applied Physics **102**: 024914.
- [Basak 2007 (a)] Basak, S., Raman, A. (2007 (a)). "Dynamics of tapping mode atomic force microscopy in liquids: Theory and experiments." Appl. Phys. Lett. **91**: 064107.
- [Basak 2006] Basak, S., Raman, A., Garimella, S.V. (2006). "Hydrodynamic loading of microcantilevers vibrating in viscous fluids." Journal of Applied Physics **99**: 114906.
- [Binnig 1986] Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986). "Atomic force microscope." Phys. Rev. Lett. **56**(9): 930-933.
- [Binnig 1982] Binnig, G., Rohrer, H. (1982). "Scanning Tunneling Microscopy." Helv. Phys. Acta. **55**: 726-735.
- [Binnig 1983] Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, G., Weibel, E. (1983). "7x7 reconstruction on Si(111) resolved in real space." Phys. Rev. Lett. **50**: 120.
- [Binnig 1986] Binnig, G., Quate, C. F., Gerber, C. (1986). "Atomic Force Microscope." Phys. Rev. Lett. **56**(9): 930-933.
- [Binnig 1982] Binnig, G., Rohrer, H. (1982). "Scanning Tunneling Microscopy." Helv. Phys. Acta. **55**: 726-735.
- [BL-RC150VB] BL-RC150VB ([www.olympus.com](http://www.olympus.com))
- [Block 1990] Block, S. M., Goldstein, L.S., Schnapp, B.J. (1990). "Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers." Nature **348**: 348-352.
- [Bothner 1999] Bothner, B., Schneemann, A., Marshall, D., Reddy, V., Johnson, J. E., Siuzdak, G. (1999). "Crystallographically identical virus capsids display different properties in solution" Nat Struct Biol **6**(2): 114-116.
- [Bruinsma 2003] Bruinsma, R. F., Gelbart, W. M., Reguera, D., Rudnick, J., Zandi, R. (2003). "Viral Self-Assembly as a Thermodynamic Process." Phys. Rev. Lett. **90**: 248101.
- [Bustamante 1995] Bustamante, C., Keller, D. (1995). "Scanning force microscopy in biology." Physics Today **48**: 32-38.
- [Butt 1995] Butt, H. J., Jaschke, M. (1995). "Calculation of thermal noise in atomic force microscopy." Nanotechnology **6**: 1-7.
- [Caplow 1994] Caplow, M., Ruhlen, R.L., Shanks, J. (1994). "The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice." J. Cell Biol. **127**: 779-788.
- [Cappella 1999] Cappella, B., Dietler, G. (1999). "Force-distance curve by atomic force microscopy." surf. Sci. Reports **34**: 1-104.
- [Carpick 1997] Carpick, R. W., Ogletree, D.F., Salmeron, M. (1997). "Lateral stiffness: A new nanomechanical measurement for the determination of shear strengths with friction force microscopy." Appl. Phys. Lett. **70**: 1548.

- [Carrasco 2006] Carrasco, C., Carreira, A., Schaap, I.A.T., Serena, P.A., Gómez-Herrero, J., Mateu, M.G., de Pablo, P.J. (2006). "DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103**(37): 13706-13711.
- [Carrasco 2008] Carrasco, C., Castellanos, M., de Pablo, P. J., Mateu, M. G. (2008). "Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering." Proc. Natl. Acad. Sci. **105**(11): 4150-4155.
- [Carrascosa 1999] Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M. (1999). "Recent research developments in virology." Transworld Reseach Network, Trivandrum
- [Carreira 2006] Carreira, A., Mateu, M. G. (2006). "Structural Tolerance versus functional intolerance to mutation of hydrophobic core residues surrounding cavities in a parvovirus capsid." J. Mol. Biol. **360**: 1081-1093.
- [Carreira 2004] Carreira, A., Menéndez, M., Reguera, J., Almendral, J. M., Mateu, M. G. (2004). "In Vitro Disassembly of a Parvovirus Capsid and Effect on Capsid Stability of Heterologous Peptide Insertions in Surface Loops." J. Biol. Chem. **279**(8): 6517-6525.
- [Carrion-Vazquez 1999] Carrion-Vazquez, M., Marszalek, P.E., Oberhauser, A.F., Fernandez, J.M. (1999). "Atomic force microscopy captures length phenotypes in single proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. **96**: 11288 -11292.
- [Case 2000] Case, R. B., Rice, S., Hart, C.L., Ly, B., Vale, R.D. (2000). "Role of the kinesin neck linker and catalytic core in microtubule-based motility." Curr. Biol. **10**: 157-160.
- [Casjens 1997] Casjens, S. (1997). "Structural Biology of Viruses." Eds Chiu, W., Garcea, R. L., Burnett, R. M. (Oxford Univ Press, Oxford), 3-37.
- [Caspar 1962] Caspar, D. L., Klug, A. (1962). "Physical principles in the construction of regular viruses." Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **21**: 1-4.
- [Cerritelli 2003] Cerritelli, M. E., Conway, J. F., Cheng, N., Trus, B. L., Steven, A. C. (2003). "Virus Structure." Adv. Protein. Chem. **64**: 301-323.
- [Cleveland 1998] Cleveland, J. P., Anczykowski, B., Schmid, A. E., Elings., V. B. (1998). "Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy." Appl. Phys. Lett. **72**: 2613-2615.
- [Cossart 1975] Cossart, Y. E., Field, A. M., Cant, B., Widdows, D. (1975). "Parvovirus-like particles in human sera." Lancet **1**(7898): 72-73.
- [Cotmore 1999] Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M., Ticknor, C. M., Tattersall, P. (1999). "Controlled Conformational Transitions in the MVM Virion Expose the VP1 N-Terminus and Viral Genome without Particle Disassembly." Virology **254**(1): 169-181.
- [Crevel 2004] Crevel, I. M., Nyitrai, M., Alonso, M. C., Weiss, S., Geeves, M. A., Cross, R. A. (2004). "What kinesin does at roadblocks: the coordination mechanism for molecular walking." EMBO J. **23**(1): 23-32.
- [Crick 1956] Crick, F. H. C., Watson, J. D. (1956). "The structure of small viruses." Nature **177**: 473-475.
- [Cunningham 1989] Cunningham, B. C., Wells, J. A. (1989). "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis " Science **244**: 1081-1085.
- [Chandra 2004] Chandra, N., Namila, S., Shet, C. (2004). "Local elastic properties of carbon nanotubes in the presence of Stone-Wales defects." Phys. Rev. B **69**(9): 094101.
- [Chapman 1995] Chapman, M. S., Rossmann, M. G. (1995). "Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus." Structure **3**(2): 151-162.
- [Chen 1994] Chen, J., Workman, R.K., Sarid, D., Hoper, R. (1994). "Numerical simulations of a scanning force microscope with a large-amplitude vibrating cantilever." Nanotechnology **5**: 199-204.

## Bibliografía

---

- [Chiu 1997] Chiu, W., Garcea, L., Burnett, M. (1997). *Structural biology of Viruses*. Oxford University Press, Oxford.
- [Da Poian 2002] Da Poian, A. T., Johnson, J. E., Silva, J. L. (2002). "Protein-RNA Interactions and Virus Stability as Probed by the Dynamics of Tryptophan Side Chains " *J. Biol. Chem.* **277**(49): 47596-47602.
- [de Pablo 1998] de Pablo, P. J., Colchero, Gómez-Herrero, J., Baró, A.M. (1998). "Jumping mode scanning force microscopy." *Appl. Phys. Lett.* **73**(22): 3300-3302.
- [de Pablo 1999] de Pablo, P. J., Colchero, Gómez-Herrero, J., Baró, A.M., Schaefer, D.M., Howell, S., Walsh, B., Reifengerger, R. (1999). "Adhesion maps using scanning force microscopy techniques." *J. Adhesion* **71**: 339-356.
- [de Pablo 2000a] de Pablo, P. J., Colchero, J., Luna, M., Gómez-Herrero, J., Baró, A.M. (2000a). "Tip-sample interaction in tapping-mode scanning force microscopy." *Phys. Rev. B* **61**(20): 14179-14183.
- [de Pablo 2003] de Pablo, P. J., Schaap, I.A.T., Schmidt, C.F. (2003). "Observation of microtubules with scanning force microscopy in liquid." *Nanotechnology* **14**: 143-146.
- [de Pablo 2003] de Pablo, P. J., Schaap, I.A.T., MacKintosh, F.C., Schmidt, C.F. (2003). "Deformation and collapse of microtubules on the nanometer scale." *Phys. Rev. Lett.* **91**(9): 098101-4.
- [Derjaguin 1941] Derjaguin, B. V., Landau, L. (1941). *Acta Physicochim.* **14**: 633.
- [Derjaguin 1975] Derjaguin, B. V., Muller, V.M., Toporov, Y.P. (1975). "Effect of contact deformations on the adhesion of particles." *J. Colloid. Interface. Sci.* **53**: 314.
- [Desai 1997] Desai, A., Mitchison, T.J. (1997). "Microtubule polymerization dynamics." *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 83-117.
- [Desai 1999] Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., Walczak, C.E. (1999). "Kin I kinesins are microtubule destabilizing enzymes." *Cell* **96**: 69-78.
- [Douglas 1998] Douglas, T., Young, M. (1998). "Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages " *Nature* **393**: 152-155.
- [Douglas 2006] Douglas, T., Young, M. (2006). "Viruses: Making Friends with Old Foes " *Science* **312**: 873-875.
- [Drechsel 1992] Drechsel, D. N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W. (1992). "Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau." *Mol. Biol. Cell* **3**: 1141-1154.
- [Drexler. 1986] Drexler, K. E. (1986). "Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology." *Anchor Press, New York*
- [Drexler. 1992] Drexler, K. E. (1992). "Nanosystems: Molecular Machinery, Manufacturing and Computation." *John Wiley, New York*
- [Endow 1999] Endow, S. A. (1999). "Microtubule motors in spindle and chromosome motility." *Eur. J. Biochem.* **262**: 12-18.
- [Evilevitch 2003] Evilevitch, A., Lavelle, L., Knobler, C. M., Raspaud, E., Gelbart, W. M. (2003). "Osmotic pressure inhibition of DNA ejection from phage " *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**(16): 9292-9295.
- [Fan 1996] Fan, J., Griffiths, A.D., Lockhart, A., Cross, R.A., Amos, L.A. (1996). "Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin." *J. Mol. Biol.* **259**: 325-30.
- [Farr 2006] Farr, G. A., Cotmore, S. F., Tattersall, P. (2006). "VP2 Cleavage and the Leucine Ring at the Base of the Fivefold Cylinder Control pH-Dependent Externalization of both the VP1 N Terminus and the Genome of Minute Virus of Mice." *J. Virol.* **80**: 161-171.

- [Faruki 1993] Faruki, S., Doree, M., Karsenti, E. (1993). "cdc2 kinase-induced destabilization of MAP2-coated microtubules in *Xenopus* egg extracts." *J. Cell. Sci.* 69–78.
- [Felgner 1997] Felgner, H., Frank, R., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., Ludin, B., Matus, A., Schliwa, M. (1997). "Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules." *J. Cell Biol.* 138: 1067–1075.
- [Felgner 1996] Felgner, H., Frank, R., Schliwa, M. (1996). "Flexural rigidity of microtubules measured with the use of optical tweezers." *J. Cell Sci.* 109: 509–516.
- [FEMLAB 3.1i] FEMLAB ( 3.1i). Comsol, Zoetermeer, The Netherlands.
- [Feynman 1959] Feynman, R. P. (1959). *There's Plenty at the Bottom*. Annual Meeting of American Physical Society, California Institute of Technology.
- [Feynman. 1959] Feynman., R. P. (1959). *There's Plenty at the Bottom*. Annual Meeting of American Physical Society, California Institute of Technology.
- [Freifelder 1966] Freifelder, D. (1966). "Effect of NaClO<sub>4</sub> on bacteriophage: Release of DNA and evidence for population heterogeneity." *Virology* 28(4): 742-750.
- [Fritz 1995] Fritz, M., Radmacher, M., Allersma, M.W., Cleveland, J.P., Stewart, R.J., Hansma, P.K., Schmidt, C.F. (1995). "Imaging microtubules in buffer solution using tapping mode atomic force microscopy." *Proc SPIE* 2384: 150–157.
- [Fuller 2007] Fuller, D. N., Raymer, D.M., Kottadiel, V.I., Rao, V.B., Smith, D.E. (2007). "Single phage T4 DNA packaging motors exhibit large force generation, high velocity, and dynamic variability." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 16868-16873.
- [García 2002] García, R., Pérez, R. (2002). "Dynamic atomic force microscopy methods." *Surf. Sci. Rep.* 47: 197-301.
- [García 1999a] García, R., San Paulo, A. (1999a). "Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes in tapping-mode atomic force microscopy." *Phys. Rev. B* 60(7): 4961-4966.
- [García 2000] García, R., San Paulo, A. (2000). "Amplitude curves and operating regimes in dynamic atomic force microscopy." *Ultramicroscopy* 82: 79-83.
- [Gau 1999] Gau, H., Herminghaus, S., Lenz, P., Lipowsky, R. (1999). "Liquid Morphologies on Structured Surfaces: From Microchannels to Microchips." *Science* 283: 46-49.
- [Giessibl 1995] Giessibl, F. J. (1995). "Atomic Resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic force microscopy." *Science* 267: 69-71.
- [Giessibl 2003] Giessibl, F. J. (2003). "Advances in atomic force microscopy." *Reviews of Modern Physics* 75: 949-983.
- [Giessibl 2000] Giessibl, F. J., Hembacher, S., Bielefeldt, H., Mannhart, J. (2000). "Subatomic features on the silicon (111)-(7x7) surface observed by atomic force microscopy." *Science* 289: 422-425.
- [Gittes 1993] Gittes, F., Mickey, B., Nettleton, J., Howard, J. (1993). "Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape." *J. Cell Biol.* 120: 923-934.
- [Gómez-Navarro 2005 Tesis Doctoral] Gómez-Navarro, C. (2005 Tesis Doctoral). *Medidas de transporte electrónico en cables moleculares: nanotubos de carbono y ADN.*, Universidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral.
- [Gonzalez-Huici 2004] Gonzalez-Huici, V., Salas, M., Hermoso, J. M. (2004). "The push-pull mechanism of bacteriophage  $\Phi$ 29 DNA injection." *Mol. Microbiol.* 52(2): 529–540.
- [Gonzalez-Huici 2006] Gonzalez-Huici, V., Salas, M., Hermoso, J. M. (2006). "Requirements for *Bacillus subtilis* bacteriophage  $\Phi$ 29 DNA ejection." *Gene* 374: 19-25.

- [**Goodman 2005**] Goodman, R. P., Schaap, I. A. T., Tardin, C. F., Erben, C. M., Berry, R. M., Schmidt, C. F., Turberfield, A. J. (2005). "*Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication* " Science **310**: 1661–1665.
- [**Gosse 2002**] Gosse, C., Croquette, V. (2002). "Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level." Biophys. J **82**: 3314–29.
- [**Green 2005**] Green, C. P., Sader, J.E. (2005). "Small amplitude oscillations of a thin beam immersed in a viscous fluid near a solid surface." Physics of Fluids **17**: 73102.
- [**Guasch 2002**] Guasch, A., Pous, J., Ibarra, B., Gomis-Rüth, F. X., Valpuesta, J. M., Sousa, N., Carrascosa, J. L., Coll, M. (2002). "*Detailed architecture of a DNA translocating machine: the high-resolution structure of the bacteriophage phi29 connector particle.*" J. Mol. Biol. **315**(4): 663–676.
- [**Gueta 2006**] Gueta, R., Barlam, D., Sheck, R.Z., Rousso, I. (2006). "*Measurement of the mechanical properties of isolated tectorial membrane using atomic force microscopy.*" Proc. Natl. Acad. Sci. **103**(40): 14790–14795.
- [**Gunawardena 2004**] Gunawardena, S., Goldstein, L. S. B. (2004). "Cargo-carrying motor vehicles on the neuronal highway: Transport pathways and neurodegenerative disease " J. Neurobiol. **58**(2): 258–271.
- [**Hackney 1994**] Hackney, D. D. (1994). "Evidence for alternating head catalysis by kinesin during microtubule-stimulated ATP hydrolysis." Proc. Natl. Acad. Sci. **91**: 6865–69.
- [**Hackney 1994**] Hackney, D. D. (1994). "The rate-limiting step in microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains occurs while bound to the microtubule." J. Biol. Chem. **269**: 16508–611.
- [**Hackney 1995**] Hackney, D. D. (1995). "Highly processive microtubule-stimulated ATP hydrolysis by dimeric kinesin head domains." Nature **377**: 448–450.
- [**Hamm 2003**] Hamm, C. E., Merkel, R., Springer, O., Jurkojc, P., Maier, C., Pechtel, K., Smetacek, V. (2003). "*Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection* " Nature **421**: 841–843.
- [**Han 1996**] Han, W., Lindsay, S.M., Jing, T. (1996). "*A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids.*" Appl. Phys. Lett. **69**(26): 4111–4113.
- [**Hancock 1998**] Hancock, W. O., Howard, J. (1998). "*Processivity of the motor protein kinesin requires two heads.*" J. Cell Biol. **140**: 1395–405.
- [**Hansma 1994**] Hansma, P. K., Cleveland, J.P., Radmacher, M., Walters, D.A., Hillner, P.E., Bezaniilla, M., Fritz, M., Vie, D., Hansma, H.G. (1994). "*Tapping mode atomic force microscopy in liquids.*" Appl. Phys. Lett. **64**(13): 1738–1740.
- [**Harrison 1993**] Harrison, B. C., Marchese-Ragona, S.P., Gilbert, S.P., Cheng, N., Steven, A.C., Johnson, K.A. (1993). "*Decoration of the microtubule surface by one kinesin head per tubulin heterodimer.*" Nature **362**: 73–75.
- [**Hernando 2000**] Hernando, E., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J. M. (2000). "*Biochemical and Physical Characterization of Parvovirus Minute Virus of Mice Virus-like Particles.*" Virology **267**(2): 299–309.
- [**Herruzo 2007**] Herruzo, E. T., Garcia, R. (2007). "Frequency response of an atomic force microscope in liquids and air: Magnetic versus acoustic excitation." Appl. Phys. Lett. **91**: 143113.
- [**Hertz 1882**] Hertz, H., Reine, J. (1882). "*On the contact of elastic solids.*" Journal für die reine und angewandte Mathematik **92**: 156–171.
- [**Higgins 2005**] Higgins, M. J., Riener, C. K., Uchihashi, T., Sader, J.E., McKendry, R., Jarvis, S.P. (2005). "*Frequency modulation atomic force microscopy: a dynamic measurement technique for biological systems.*" Nanotechnology **16**: S85–S89.

- [Higuchi 2002] Higuchi, H., Endow, S.A. (2002). "Directionality and processivity of molecular motors." *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 50-57.
- [Hinterdorfer 1996] Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K., Schilcher, H. (1996). "Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**(8): 3477-3481.
- [Hirokawa 1998] Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." *Science* **279**: 519-526.
- [Hirokawa 1998] Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." *Science* **279**: 519-526.
- [Hirokawa 1988] Hirokawa, N., Shiomura, Y., Okabe, S. (1988). "Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules." *J. Cell Biol.* **107**: 1449-1459.
- [Hirose 1995] Hirose, K., Lockhart, A., Cross, R.A., Amos, L.A. (1995). "Nucleotide-dependent angular change in kinesin motor domain bound to tubulin." *Nature* **376**: 277-279.
- [Höber 2003] Höber, J. K. H., Miles, M.J. (2003). "Scanning probe evolution in biology." *Science* **302**: 1002-1005.
- [Hoenger 1995] Hoenger, A., Sablin, E.P., Vale, R.D., Fletterick, R.J., Milligan, R.A. (1995). "Three-dimensional structure of a tubulin-motor-protein complex." *Nature* **376**: 271-274.
- [Horcas 2007] Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baró, A.M. (2007). "WSxM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology." *Rev Sci Instrum* **78**: 013705-013708.
- [Horio 1986] Horio, T., Hotani, H. (1986). "Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy." *Nature* **321**: 605.
- [Howard 1996] Howard, J. (1996). "The movement of kinesin along microtubules." *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 703-729.
- [Howard 2001] Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- [Hu 2007] Hu, S., Raman, A. (2007). "Analytical formulas and scaling laws for peak interaction forces in dynamic atomic force microscopy." *Appl. Phys. Lett.* **91**: 123106.
- [Hua 2002] Hua, W., Chung, J., Gelles, J. (2002). "Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements." *Science* **295**: 844-848.
- [Hua 1997] Hua, W., Young, E.C., Fleming, M.L., Gelles, J. (1997). "Coupling of kinesin steps to ATP hydrolysis." *Nature* **388**(6640): 390-393.
- [Huang 2003] Huang, X., Margulis, C. J., Berne, B. J. (2003). "Dewetting-induced collapse of hydrophobic particles." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 11953-11958.
- [Hurd 1996] Hurd, D. D., Saxton, W. M. (1996). "Kinesin Mutations Cause Motor Neuron Disease Phenotypes by Disrupting Fast Axonal Transport in Drosophila." *Genetics* **144**(3): 1075-1085.
- [Ibarra 2000] Ibarra, B., Castón, J. R., Llorca, O., Valle, M., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. (2000). "Topology of the components of the DNA packaging machinery in the phage  $\phi$ 29 prohead." *J. Mol. Biol.* **298**(5): 807-815.
- [Israelachvili 1991] Israelachvili, J. (1991). "Intermolecular and Surface Forces." Academic Press, London.
- [Israelachvili 1996] Israelachvili, J., Wennerström, H. (1996). "Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions." *Nature* **379**: 219-225.
- [Ivanovska 2007] Ivanovska, I., Wuite, G., Jönsson, B., Evilevitch, A. (2007). "Internal DNA pressure modifies stability of WT phage." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**(23): 9603-9608.

- [Ivanovska 2004] Ivanovska, I. L., de Pablo, P.J., Ibarra, B., Sgalari, G., MacKintosh, F.C., Carrascosa, J.L., Schmidt, C.F., Wuite, G.J.L. (2004). "Bacteriophage capsids: Tough nanoshells with complex elastic properties." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(20): 7600–7605.
- [Ivanovski 1982] Ivanovski, D. (1982). "Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze." *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg. Nouv. Ser.* **35**(3): 67-70.
- [Janshoff 2000] Janshoff, A., Neitzert, M., Obersörfer, Y., Funchs, H. (2000). "Force spectroscopy of molecular system-single molecule spectroscopy of polymers and biomolecules." *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**: 3212-3237.
- [Jiang 1997] Jiang, W., Stock, M.F., Li, X., Hackney, D.D. (1997). "Influence of the kinesin neck domain on dimerization and ATPase kinetics." *J. Biol. Chem.* **272**: 7626-32.
- [Johnson 1997] Johnson, J. E., Rueckert, R. R. (1997). "Structural Biology of Viruses." Eds Chiu, W., Garcea, R. L., Burnett, R. M. (Oxford Univ Press, Oxford), 269-287.
- [Johnson 2001] Johnson, K. L. (2001). *Contact Mechanics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [Johnson 1971] Johnson, K. L., Kendall, K., Roberts, A.D. (1971). "Surface energy and the contact of elastic solids." *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **324**: 301.
- [Kacher 2000] Kacher, C. M., Weiss, I.M., Stewart, R.J., Schmidt, C.F., Hansma, P.K., Radmacher, M., Fritz, M. (2000). "Imaging microtubules and kinesin decorated microtubules using tapping mode atomic force microscopy in fluids." *Eur. Biophys. J.* **28**: 611-620.
- [Kallipolitou 2001] Kallipolitou, A., Deluca, D., Majdic, U., Lakamper, S., Cross, R., Meyhöfer, E., Moroder, L., Schliwa, M., Woehlke, G. (2001). "Unusual properties of the fungal conventional kinesin neck domain from *Neurospora crassa*." *EMBO J.* **20**: 6226–6235.
- [Kar 2003] Kar, S., Fan, J., Smith, M.J., Goedert, M., Amos, L.A. (2003). "Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol." *EMBO J.* **22**: 70–77.
- [Kasas 1997] Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, P.K., Miklossy, J., Hansma, H.G. (1997). "Biological applications of the AFM: from single molecules to organs." *Int. J. Imaging Syst. Technol.* **8**: 151-161.
- [Kaseda 2003] Kaseda, K., Higuchi, H., Hirose, K. (2003). "Alternate fast and slow stepping of a heterodimeric kinesin molecule." *Nat Cell Biol.* **5**: 1079-1082.
- [Katsuki 1999] Katsuki, M., Tokuraku, K., Murofushi, H., Kotani, S. (1999). "Functional analysis of microtubule-binding domain of bovine MAP4." *Cell Struct. Funct.* **24**: 337–344.
- [Kawaguchi 2001] Kawaguchi, K., Ishiwata, S. (2001). "Nucleotide-dependent single- to double-headed binding of kinesin." *Science* **291**: 667-669.
- [Kienberger 2003] Kienberger, F., Stroh, C., Kada, G., Moser, R., Baumgartner, W., Pastushenko, V., Rankl, C., Schmidt, U., Müller, H., Orlova, E., LeGrimellec, C., Drenckhahn, D., Blaas, D., Hinterdorfer, P. (2003). "Dynamic force microscopy imaging of native membranes." *Ultramicroscopy* **97**: 229–237.
- [Kienberger 2004] Kienberger, F., Zhu, R., Moser, R., Blaas, D., Hinterdorfer, P. (2004). "Monitoring RNA Release from Human Rhinovirus by Dynamic Force Microscopy." *J. Virol.* **78**: 3203-3209.
- [Kikkawa 1995] Kikkawa, M., Ishikawa, T., Wakabayashi, T., Hirokawa, N. (1995). "Three-dimensional structure of the kinesin head-microtubule complex." *Nature* **376**: 274–277.
- [Klug 2006] Klug, W. S., Bruinsma, R. F., Michel, J-P., Knobler, C. M., Ivanovska, I. L., Schmidt, C. F., Wuite, G. J. L. (2006). "Failure of Viral Shells." *Phys. Rev. Lett.* **97**: 228101.
- [Kokavecz 2007] Kokavecz, J., Mechler, A. (2007). "Investigation of fluid cell resonances in intermittent contact mode atomic force microscopy." *Appl. Phys. Lett.* **91**: 023113.



- [Kol 2006] Kol, N., Gladnikoff, M., Barlam, D., Shneck, R. Z., Rein, A., Rouso, I. (2006). "Mechanical Properties of Murine Leukemia Virus Particles: Effect of Maturation." *Biophys J* **91**: 767–774.
- [Kol 2007] Kol, N., Tsvitov, M., Barlam, D., Shneck, R. Z., Kay, M. S., Rouso, I. (2007). "A Stiffness Switch in Human Immunodeficiency Virus." *Biophys J* **92**: 1777–1783.
- [Kontou 2005] Kontou, M., Govindasamy, L., Nam, H. J., Bryant, N., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., Hernando, E., Rubio, M. P., McKenna, R., Almendral, J. M., Agbandje-McKenna, M. (2005). "Structural Determinants of Tissue Tropism and In Vivo Pathogenicity for the Parvovirus Minute Virus of Mice." *J. Virol.* **79**: 10931–10943.
- [Kowalski 1993] Kowalski, R. J., Williams Jr., R.C. (1993). "Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly." *J. Biol. Chem.* **268**: 9847–9855.
- [Kozielski 1997] Kozielski, F., Sack, S., Marx, A., Thormählen, M., Schönbrunn, E., Biou, V., Thompson, A., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1997). "The Crystal Structure of Dimeric Kinesin and Implications for Microtubule-Dependent Motility." *Cell* **91**(7): 985–994.
- [Landau 1986] Landau, L. D., Lifshitz, E.M. (1986). *Theory of Elasticity*. Butterworth-Heinemann, Boston.
- [Lau 1989] Lau, F. T., Fersht, A. R. (1989). "Dissection of the effector-binding site and complementation studies of Escherichia coli phosphofructokinase using site-directed mutagenesis." *Biochemistry* **28**(17): 6841–6847.
- [Lawrence 2004] Lawrence, C. J., Dawe, R.K., Christie, K.R., Cleveland, D.W., Dawson, S.C., et. al (2004). "A standardized kinesin nomenclature." *J. Cell Biol.* **167**: 19–22.
- [Lee 1988] Lee, G., Cowan, N., Kirschner, M. (1988). "The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain." *Science* **239**: 285–288.
- [Lee 2001] Lee, V. M., Goedert, M., Trojanowski, J.Q. (2001). "Neurodegenerative tauopathies." *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 1121–1159.
- [Legleiter 2006] Legleiter, J., Park, M., Cusick, B., Kowalewski, T. (2006). "Scanning probe acceleration microscopy (SPAM) in fluids: Mapping mechanical properties of surfaces at the nanoscale." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 4813–4818.
- [Legleiter 2005] Legleiter, K., T. (2005). "Insights into fluid tapping-mode atomic force microscopy provided by numerical simulations." *Appl. Phys. Lett.* **87**: 163120.
- [Li 2002] Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E., Downing, K. H. (2002). "Microtubule structure at 8Å resolution." *Structure* **10**: 1317–1328.
- [Liddington 1991] Liddington, R. C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T. L., Harrison, S. C. (1991). "Structure of simian virus 40 at 3.8-angstrom resolution." *Nature* **354**: 278–284.
- [Lidmar 2003] Lidmar, J., Mirny, L., Nelson, D. R. (2003). "Virus shapes and buckling transitions in spherical shells." *Phys. Rev. E.* **68**(5): 051910.
- [Maali 2006] Maali, A., Hurth, C., Cohen-Bouhacina, T., Couturier, G., Aimé, J-P. (2006). "Improved acoustic excitation of atomic force microscope cantilevers in liquids." *Appl. Phys. Lett.* **88**: 163504.
- [Maeda 2003] Maeda, N., Israelachvili, J. N., Kohonen, M. M. (2003). "Evaporation and instabilities of microscopic capillary bridges." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**(3): 803–808.
- [Magonov 1997] Magonov, S. N., Elings, V., Whangbo, M.H. (1997). "Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy." *Surf. Sci.* **375**: L385–L394.
- [Major 2006] Major, R. C., Houston, J. E., McGrath, M. J., Siepmann, J. I., Zhu, X.-Y. (2006). "Viscous Water Meniscus under Nanoconfinement." *Phys. Rev. Lett.* **96**(17): 177803.

## Bibliografía

---

- [**Martin 2007**] Martin, C. P., Blunt, M. O., Pauliac-Vaujour, E., Stannard, A., Moriarty, P., Vancea, I., Thiele, U. (2007). "Controlling pattern formation in nanoparticle assemblies via directed solvent dewetting." *Phys. Rev. Lett.* **99**(11): 116103.
- [**Martin 1987**] Martin, Y., Williams, C.C., Wickramasinghe, H.K. (1987). "Atomic force microscopy mapping and profiling on a sub 100-Å scale." *J. Appl. Phys.* **61**: 4723-4729.
- [**Melcher 2007**] Melcher, J., Hu, S., Raman, A. (2007). "Equivalent point-mass models of continuous atomic force microscope probes." *Appl. Phys. Lett.* **91**: 053101.
- [**Merkel 1999**] Merkel, R., Nassoy, P., Leung, A., Ritchie, K., Evans, E. (1999). "Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy." *Nature* **397**: 50-53.
- [**Meurer-Grob 2001**] Meurer-Grob, P., Kasparian, J., Wade, R.H. (2001). "Microtubule structure at improved resolution." *Biochemistry* **40**: 8000-8008.
- [**Meyer 1988**] Meyer, G., Amer, N.M. (1988). "Novel approach to atomic force microscopy." *Appl. Phys. Lett.* **53**: 1045.
- [**Mickey 1995**] Mickey, B., Howard, J. (1995). "Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents." *J. Cell Biol.* **130**: 909-917.
- [**Michel 2006**] Michel, J. P., Ivanovska, I. L., Gibbons, M. M., Klug, W. S., Knobler, C. M., Wuite, G. J. L., Schmidt, C. F. (2006). "Nanoindentation studies of full and empty viral capsids and the effects of capsid protein mutations on elasticity and strength." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**(16): 6184-6189.
- [**Mitchison 1984**] Mitchison, T., Kirschner, M. (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**: 237.
- [**Möller 1999**] Möller, C., Allen, M., Elings, V., Engel, A., Müller, D.J. (1999). "Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-Resolution Images of Protein Surfaces." *Biophys. J.* **77**: 1150-1158.
- [**Moody 1999**] Moody, M. F. (1999). "Geometry of phage head construction." *J. Mol. Biol.* **293**(2): 401-433.
- [**Moore 1965**] Moore, G. E. (1965). *Electronics* **38**: 114.
- [**Morais 2005**] Morais, M. C., Choi, K. H., Koti, J. S., Chipman, P. R., Anderson, D. L., Rossmann, M. G. (2005). "Conservation of the Capsid Structure in Tailed dsDNA Bacteriophages: the Pseudoatomic Structure of phi 29." *Mol. Cell* **18**: 149-159.
- [**Morais 2003**] Morais, M. C., Kanamaru, S., Badasso, M. O., Koti, J. S., Owen, B. A. L., McMurray, C. T., Anderson, D. L., Rossmann, M. G. (2003). "Bacteriophage phi29 scaffolding protein gp7 before and after prohead assembly." *Nat. Struct. Biol.* **10**(7): 572-576.
- [**Moreno-Herrero 2005**] Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N.H., Kanaar, R., Wyman, C., Dekker, C. (2005). "Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA." *Nature* **437**: 440-443.
- [**Moreno-Herrero 2002**] Moreno-Herrero, F., de Pablo, P. J., Fernández-Sánchez, R., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baró, A. M. (2002). "Scanning force microscopy jumping and tapping modes in liquids." *Appl. Phys. Lett.* **81**(14): 2620-2622.
- [**Moreno-Herrero 2000**] Moreno-Herrero, F., de Pablo, P.J., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baró, A.M. (2000). "The role of shear forces in scanning force microscopy: a comparison between the jumping mode and tapping mode." *Surf. Sci.* **453**: 152-158.
- [**Moreno Herrero 2003 Tesis Doctoral**] Moreno Herrero, F. (2003 Tesis Doctoral). *Aplicaciones de la microscopía de fuerzas al estudio de sistemas de moléculas biológicas individuales*, Universidad Autónoma de Madrid. **Tesis Doctoral**.

- [Moreno Herrero 2004] Moreno Herrero, F., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baró, A.M. (2004). "Atomic force microscopy contact, tapping, and jumping modes for imaging biological samples in liquids." *Phys. Rev. E* **69**(3): 031915-9.
- [Müller 1999] Müller, D. J., Baumeister, W., & Engel, A. (1999). "Controlled unzipping of a bacterial surface layer with atomic force microscopy." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(23): 13170-13174.
- [Müller 1995] Müller, D. J., Schabert, F. A., Büldt, G. & Engel, A. (1995). "Imaging purple membranes in aqueous solutions at subnanometer resolution by atomic force microscopy." *Biophys. J.* **68**: 1681-1686.
- [Murphy 1995] Murphy, M., O'Neill, L.A. (editores) (1995). *What is Life? The next fifty years. Speculations on the future of Biology.*, Cambridge, Cambridge University Press.
- [Nogales 1999] Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., Downing, K. H. (1999). "High-resolution model of the microtubule." *Cell* **96**: 79-88.
- [Nogales 1998] Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H. (1998). "Structure of the  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin dimer by electron crystallography." *Nature* **391**: 199-203.
- [Nonaka 1998] Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., et al. (1998). "Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein." *Cell* **95**: 829-837.
- [Nony 1999] Nony, L., Boisgard, R., Aimé, J.P. (1999). "Nonlinear dynamical properties of an oscillating tip-cantilever system in the tapping mode." *J. Chem. Phys.* **111**(4): 1615-1627.
- [Noy 1998] Noy, A., Sanders, C.H., Vezennov, D.V., Wong, S.S., Lieber, C. (1998). "Chemically-Sensitive Imaging in Tapping Mode by Chemical Force Microscopy: Relationship between Phase Lag and Adhesion." *Langmuir* **14**(7): 1508.
- [O'Shea 1998] O'Shea, S. J., Welland, M.E. (1998). "Atomic Force Microscopy at Solid-Liquid Interfaces." *Langmuir* **14**: 4186-4197.
- [Oesterhelt 2000] Oesterhelt, F., Oesterhelt, D., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H.E., Müller, D.J. (2000). "Unfolding pathways of individual bacteriorhodopsins." *Science* **288**: 143-146.
- [OMCL-RC800PSA] OMCL-RC800PSA ([www.olympus.com](http://www.olympus.com))
- [Peterman 2004] Peterman, E. J. G., Sosa, H., Moerner, W.E. (2004). "Single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy of molecular motors." *Annual Review of Phy. Chem.* **55**: 79-96.
- [Pierson 1978] Pierson, G. B., Burton, P. R., Himes, R. H. (1978). "Alterations in number of protofilaments in microtubules assembled in vitro." *J. Cell Biol.* **76**: 223-228.
- [Purohit 2005] Purohit, P. K., Inamdar, M. M., Grayson, P. D., Squires, T. M., Kondev, J., Phillips, R. (2005). "Forces during Bacteriophage DNA Packaging and Ejection." *Biophys. J.* **88**: 851-866.
- [Putman 1994 (a)] Putman, C. A. J., K.O. Van der Werf, B.G. De Grooth, N.F. Van Hulst, and J.Greve. (1994 (a)). "Tapping mode atomic force microscopy in liquid." *Appl. Phys. Lett.* **64**: 2454-2456.
- [Putman 1994 (b)] Putman, C. A. J., K.O. Van der Werf, B.G. De Grooth, N.F. Van Hulst, and J.Greve. (1994 (b)). "Viscoelasticity of Living Cells Allows High Resolution Imaging by Tapping Mode Atomic Force Microscopy." *Biophys. J.* **67**: 1749-1753.
- [Radmacher 1996] Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C.M., Cleveland, J.P., Hansma, P.K. (1996). "Measuring the Viscoelastic Properties of Human Platelets with the Atomic Force Microscope." *Biophys. J.* **70**(1): 556-567.
- [Ray 1993] Ray, S., Meyhöfer, E., Milligan, R.A., Howard, J. (1993). "Kinesin follows the microtubule's protofilament axis." *J. Cell Biol.* **121**: 1083-93.

- [Reddy 1998] Reddy, V. S., Giesing, H. A., Morton, R. T., Kumar, A., Post, C. B., Brooks, C. L., III., Johnson, J. E. (1998). "Energetics of quasiequivalence: computational analysis of protein-protein interactions in icosahedral viruses." *Biophys. J.* **74**: 546-558.
- [Reguera 2004] Reguera, J., Carreira, A., Riobobos, L., Almendral, J. M., Mateu, M. G. (2004). "Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**(9): 2724-2729.
- [Reguera 2005] Reguera, J., Grueso, E., Carreira, A., Sanchez-Martinez, C., Almendral, J. M., Mateu, M. G. (2005). "Functional Relevance of Amino Acid Residues Involved in Interactions with Ordered Nucleic Acid in a Spherical Virus." *J. Biol. Chem.* **280**(18): 17969-17977.
- [Revenko 2000] Revenko, I., Proksch, R. (2000). "Magnetic and acoustic tapping mode microscopy of liquid phase phospholipid bilayers and DNA molecules." *J. Appl. Phys.* **87**: 526.
- [Ritort 2006] Ritort, F. (2006). "Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications." *J. Phys.: Condens. Matter* **18**: R531-R583.
- [Robertson 1992] Robertson, D. H., Brenner, D. W., Mintmire, J. W. (1992). "Energetics of nanoscale graphitic tubules." *Phys. Rev. B* **45**(21): 12592-12595.
- [Rosa-Zeise 1997] Rosa-Zeise, A., Weilandt, E., Hild, S., Marti, O. (1997). "The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation." *Meas. Sci. Technol.* **8**: 1333.
- [Rosenfeld 2003] Rosenfeld, S. S., Fordyce, P.M., Jefferson, G.M., King, P.H., Block, S.M. (2003). "Stepping and Stretching. How kinesin uses internal strain to walk processively." *J. Biol. Chem.* **278**(20): 18550 - 18556. .
- [Sader 1998] Sader, J. E. (1998). "Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope." *J. Appl. Phys.* **84**: 64.
- [Sader 1999] Sader, J. E., J.W.M. Chon, and P. Mulvaney. (1999). "Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers." *Rev Sci Instrum* **70**: 3967-3969.
- [Sáenz 1987] Sáenz, J. J., García, N., Grütter, P., Meyer, E., Heinzelmann, H., Wiesendanger, R., Rosenthaler, L., Hidber, H. R., Güntherodt, H. J. (1987). "Observation of magnetic forces by the atomic force microscope." *J. Appl. Phys.* **62**(10): 4293-4295.
- [Sambongi 1999] Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., Futai, M. (1999). "Mechanical Rotation of the c Subunit Oligomer in ATP Synthase (F0F1): Direct Observation." *Science* **286**(5445): 1722 - 1724.
- [San Paulo 2000] San Paulo, A., Garcia, R. (2000). "High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes." *Biophys. J* **78**(3): 1599-1605.
- [Santarella 2004] Santarella, R. A., Skiniotis, G., Goldie, K.N., Tittmann, P., Gross, H., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., Hoenger, A. (2004). "Surface decoration of microtubules by human tau." *J. Mol. Biol.* **339**: 539-553.
- [Sbragaglia 2006] Sbragaglia, M., Benzi, R., Biferale, L., Succi, S., Toschi, F. (2006). "Surface Roughness-Hydrophobicity Coupling in Microchannel and Nanochannel Flows." *Phys. Rev. Lett.* **97**: 204503.
- [Scott 1992] Scott, C. W., Klika, A.B., Lo, M.M., Norris, T.E., Caputo, C.B. (1992). "Tau protein induces bundling of microtubules in vitro: comparison of different tau isoforms and a tau protein fragment." *J. Neurosci. Res.* **33**: 19-29.
- [Schaap 2006] Schaap, I. A. T., Carrasco, C., de Pablo, P.J., MacKintosh, F.C., Schmidt, C.F. (2006). "Elastic Response, Buckling, and Instability of Microtubules under Radial Indentation." *Biophys. J* **91**: 1521-1531.

- [Schaap 2004] Schaap, I. A. T., de Pablo, P.J., F.C., Schmidt, C.F. (2004). "Resolving the molecular structure of microtubules under physiological conditions with scanning force microscopy." *Eur. Biophys.J.* **33**: 462-467.
- [Schäffer 1996] Schäffer, T. E., Cleveland, J.P., Ohnesorge, F., Walters, D.A., Hansma, P.K. (1996). "Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid." *Journal of Applied Physics* **80**(7): 3622-3627.
- [Schmalz 1929] Schmalz, G. (1929). "Über Glatte und Ebenheit als physikalisches und physiologisches Problems." *Zeitschrift des Vereimes deutscher Ingenieure*: 1461-1467.
- [Schnitzer 1997] Schnitzer, M. J., Block, S.M. (1997). "Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step." *Nature* **388**: 386-390.
- [Schrödinger 1944] Schrödinger, E. (1944). "What is Life?" *Cambridge University Press*
- [Schweers 1994] Schweers, O., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., Mandelkow, E. (1994). "Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure." *J. Biol. Chem.* **269**: 24290-24297.
- [Seiler 2000] Seiler, S., Kirchner, J., Horn, C., Kallipolitou, A., Woehlke, G., Schliwa, M. (2000). "Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin." *Nat. Cell Biol.* **2**: 333-338.
- [Seitz 2006] Seitz, A., Surrey, T. (2006). "Processive movement of single kinesins on crowded microtubules visualized using quantum dots." *EMBO J.* **25**(2): 267-277.
- [Shao 1996] Shao, Z., Mou, J., Czajkowsky, D. M., Yang, J., Yuan, J-Y (1996). "Biological atomic force microscopy: what is achieved and what is needed." *Advances in Physics* **45**: 1-86.
- [Shih 2004] Shih, W. M., Quispe, J. D., Joyce, G. F. (2004). "A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron " *Nature* **427**: 618-621.
- [Simpson 2000] Simpson, A. A., Tao, Y., Leiman, P. G., Badasso, M. O., He, Y., Jardine, P. J., Olson, N. H., Morais, M. C., Grimes, S., Anderson, D. L., Baker, T. S., Rossmann, M. G. (2000). "Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor " *Nature* **408**: 745-750.
- [Skiniotis 2003] Skiniotis, G., Surrey, T., Altmann, S., Gross, H., Song, Y.H., Mandelkow, E., Hoenger, A. (2003). "Nucleotide-induced conformations in the neck region of dimeric kinesin." *EMBO J.* **22**(7): 1518-1528.
- [Smith 2001] Smith, E., Tans, J., B., Grimes, S., Anderson, Bustamante, C. (2001). "The bacteriophage phi 29 portal motor can package DNA against a large internal force " *Nature* **413**: 748-752.
- [Snyder 2001] Snyder, J. P., Nettles, J.H., Cornett, B., Downing, K.H., Nogales, E. (2001). "The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 5312-5306.
- [Song 1993] Song, Y. H., Mandelkow, E. (1993). "Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**(5): 1671-1675.
- [Sotres 2007] Sotres, J., Lostao, A., Gómez-Moreno, C., Baró, A.M. (2007). "Jumping mode AFM imaging of biomolecules in the repulsive electrical double layer." *Ultramicroscopy* **107**(12): 1207-1212.
- [Sprakel 2007] Sprakel, J., Besseling, N. A. M., Leermakers, F. A. M., Cohen Stuart, M. A. (2007). "Equilibrium Capillary Forces with Atomic Force Microscopy." *Phys. Rev. Lett.* **99**: 104504.
- [Stanley 1936] Stanley, W. M., Loring, H. S. (1936). "The isolation of crystalline tobacco mosaic virus protein from diseased tomato plants." *Science* **83**(2143): 85.

- [**Steinberg 1996**] Steinberg, G., Schliwa, M. (1996). "Characterization of the biophysical and motility properties of kinesin from the fungus *Neurospora crassa*." *J. Biol. Chem.* **271**: 7516-7521.
- [**Sugimoto 2007**] Sugimoto, Y., Pou, P., Abe, M., Jelinek, P., Pérez, R., Morita, S., Custance, O. (2007). "Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy." *Nature* **446**: 64-67.
- [**Svoboda 1993**] Svoboda, K., Schmidt, C.F., Schnapp, B.J., Block, S.M. (1993). "Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry." *Nature* **365**: 721-727.
- [**Tamayo 1998**] Tamayo, J., Garcia, R. (1998). "Relationship between phase shift and energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy." *Appl. Phys. Lett.* **73**: 2926.
- [**Tamayo 1997**] Tamayo, J., Garcia, R. (1997). "Effects of elastic and inelastic interactions on phase contrast images in tapping-mode scanning force microscopy." *Appl. Phys. Lett.* **71**: 2394-2396.
- [**Taniguchi. 1974**] Taniguchi, N. (1974). "On the Basic Concept of Nanotechnology." *Actas de la ICPE (International Conference on Production Eng.) Tokyo*: 18-23.
- [**Tao 1998**] Tao, Y. Z., Olson, N. H., Xu, W., Anderson, D. L., Rossmann, M. G., Baker, T. S. (1998). "Assembly of a Tailed Bacterial Virus and Its Genome Release Studied in Three Dimensions." *Cell* **95**: 431-437.
- [**Teschke 2003**] Teschke, C. M., McGough, A., Thuman-Commike, P. A. (2003). "Penton Release from P22 Heat-Expanded Capsids Suggests Importance of Stabilizing Penton-Hexon Interactions during Capsid Maturation." *Biophys J* **84**: 2585-2592.
- [**Tilney 1973**] Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., Snyder, D. H. (1973). "Microtubules: evidence for 13 protofilaments." *J. Cell Biol.* **59**: 267-275.
- [**Tran 1997**] Tran, P. T., Joshi, P., Salmon, E.D. (1997). "Howtubulin subunits are lost from the shortening ends of microtubules." *J. Struct. Biol.* **118**: 107-118.
- [**Tran 1997**] Tran, P. T., Walker, R.A., Salmon, E.D. (1997). "A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends." *J. Cell Biol.* **138**(1): 119-130.
- [**Tsao 1991**] Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W., Parrish, C. R. (1991). "The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications." *Science* **251**: 1456-1464.
- [**Turner 1995**] Turner, D. C., Chang, C., Fang, K., Brandow, S. L., Murphy, D. B. (1995). "Selective Adhesion of Functional, Microtubules to Patterned Silane Surfaces." *Biophys J* **69**: 2782-2789.
- [**van Delden 2005**] van Delden, R. A., ter Wiel, M.K.J., Pollard, M.M., Vicario, J., Koumura, N., Feringa, B.L. (2005). "Unidirectional molecular motor on a gold surface." *Nature* **437**: 1337-1340.
- [**van Regenmortel 2000**] van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (2000). "Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." *Academic Press, San Diego, CA*.
- [**Vanburen 2005**] Vanburen, V., Cassimeris, L., Odde, D. J. (2005). "A Mechanochemical Model of Microtubule Structure and Self-Assembly Kinetics." *Biophys. J* **89**: 2911-2926.
- [**Vanburen 2002**] Vanburen, V., Odde, D. J., Cassimeris, L. (2002). "Estimates of lateral and longitudinal bond energies within the microtubule lattice." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 6035-6040.

- [Venier 1994] Venier, P., Maggs, A. C., Carlier, M. F., Pantaloni, D. (1994). "Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations." *J. Biol. Chem.* **269**: 13353–13360.
- [Verwey 1948] Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G. (1948). "Theory of the stability of lyophobic colloids." *Elsevier Publishing Company, New York.*
- [Villarrubia 1997] Villarrubia, J. S. (1997). "Algoritms for Scanned Probe Microscope Image Simulation, Surface Reconstruction, and Tip Estimation." *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **102**: 425-454.
- [Vinckier 1996] Vinckier, A., Dumortier, C., Engelborghs, Y., Hellemans, L. (1996). "Dynamical and mechanical study of immobilized microtubules with atomic force microscopy." *J Vac Sci Technol B* **14**: 1427–1431.
- [Watson 1953] Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953). "Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid." *Nature* **171**: 737-738.
- [Weisenhom 1989] Weisenhom, A. L., Hansma, P.K., Aihrecht, T.E., Quate, C.F. (1989). "Forces in atomic force microscopy in air and water." *Appl. Phys. Lett.* **54**: 2651-2653.
- [Willemsen 2000] Willemsen, O. H., Snel, M.M.E., Cambi, A., Greve, J., De Grooth, B.G., Figdor, C.G. (2000). "Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy." *Biophys. J.* **79**: 3267-3281.
- [Williams 1982] Williams, R. C., Jr., Lee, J. C. (1982). "Preparation of tubulin from brain." *Methods in Enzymology* **85**: 376-385.
- [Xu aceptado] Xu, X., Carrasco, C., de Pablo, P.J., Gomez-Herrero, J., Raman, A. (aceptado). "Unmasking Imaging Forces on Soft Biological Samples in Liquids When Using Dynamic Atomic Force Microscopy: Case Study on Viral Capsids." *Biophys. J*
- [Xu 2007] Xu, X., Raman, A. (2007). "Comparative dynamics of magnetically, acoustically, and brownian motion driven microcantilevers in liquids." *Journal of Applied Physics* **102**: 034303.
- [Yildiz 2004] Yildiz, A., Tomishige, M., Vale, R.D., Selvin, P.R. (2004). "Kinesin walks hand-over-hand." *Science* **303**: 676-678.
- [Young 1972] Young, R., Ward, J., Scire, F. (1972). "An instrument for measuring surface microtopography." *Rev. Sci. Instrum.* **43**: 999-1011.
- [Yurke 2000] Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, A.P., Jr, Simmel, F.C., Neumann, J.L. (2000). "A DNA-fuelled molecular machine made of DNA " *Nature* **406**: 605-608.
- [Zandi 2005] Zandi, R., Reguera, D. (2005). "Mechanical properties of viral capsids." *Phys. Rev. E.* **72**(2): 021917.
- [Zandi 2004] Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R. F., Gelbart, W. M., Rudnick, J. (2004). "Origin of icosahedral symmetry in viruses " *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**(44): 15556–15560.
- [Zhong 1993] Zhong, O., Inniss, D., Kjoller, K., Elings, V.B. (1993). "Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy." *Surf. Sci.* **290**: L688-692.
- [Zingsheim 1979] Zingsheim, H. P., Herzog, W., Weber, K. (1979). "Differences in surface morphology of microtubules reconstituted from pure brain tubulin using two different microtubule-associated proteins: the high molecular weight MAP 2 proteins and tau proteins." *Eur. J. Cell Biol.* **19**: 175-183.